







Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41555626\\_0058](https://archive.org/details/IA41555626_0058)



Die Beeinflußbarkeit des tagesrhythmischen Aktivitäts-  
verhaltens des Flußkrebsees *Astacus leptodactylus* durch  
Drogen

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
des Fachbereiches Biologie der  
Ludwig-Maximilians-Universität  
München

Vorgelegt von  
Christoph Künast  
aus Rosenheim

München 1977



1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Renner

2. Berichterstatter: Prof. Dr. J. Jacobs

Tag der mündlichen Prüfung: 7.12.77

## Gliederung

|                                                                                       |       |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| A. Einleitung                                                                         | S. 1  |
| B. Material und Methoden                                                              | S. 3  |
| C. Das ungestörte Aktivitätsverhalten bei L/D und D/D                                 | S. 7  |
| 1) Ein typisches Aktogramm                                                            | S. 7  |
| 2) Zusammenfassung weiterer Eigenschaften des Aktivitätsmusters bei L/D und D/D       | S. 9  |
| a) Periodenlängen                                                                     | S. 9  |
| b) Transients und Varianz der Periodenlängen in D/D                                   | S. 10 |
| c) Reaktion auf starke Abweichungen der Periodenlänge vom Mittelwert                  | S. 13 |
| d) Aktivitätsbeginn bei Licht-Aus                                                     | S. 15 |
| e) Weiterlaufender Licht-Ein-Peak und zusammenfassendes Periodogramm                  | S. 16 |
| f) Häutung                                                                            | S. 18 |
| 3) Diskussion                                                                         | S. 20 |
| D. Der frei laufende Rhythmus unter dem Einfluß von Drogen                            | S. 21 |
| 1) Wirkung der Drogen                                                                 | S. 22 |
| 2) Diskussion                                                                         | S. 29 |
| E. Das tagesrhythmische Verhalten in Theophyllinlösung bei L/D und anschließendem D/D | S. 32 |
| 1) Die Periodenlängen in theophyllinhaltigem Medium                                   | S. 32 |
| 2) Der Aktivitätsbeginn bei L/D                                                       | S. 33 |
| 3) Transients                                                                         | S. 35 |
| 4) Der Aktivitätsbeginn nach Licht-Ein                                                | S. 35 |
| 5) Die Fortsetzung des Licht-Ein-Peaks in D/D                                         | S. 38 |
| 6) Diskussion                                                                         | S. 39 |
| F. Die circadiane Aktivitätsrhythmik unter dem Einfluß von Cycloheximid               | S. 42 |
| 1) Fragestellung und bisherige Ergebnisse                                             | S. 42 |
| 2) Die Wirkung auf den frei laufenden Aktivitätsrhythmus von <i>A. leptodactylus</i>  | S. 43 |
| 3) Diskussion                                                                         | S. 49 |
| G. Zusammenfassung                                                                    | S. 51 |



## A. Einleitung

Biologische Tagesrhythmen kennt jeder, entweder durch die Beobachtung an sich selbst oder durch die seiner belebten Umwelt. "Belebt" ist hier im vollen Umfang seiner Bedeutung aufzufassen; nicht nur höhere Tiere, sondern auch Pflanzen, Pilze und andere, meist als "niedrig" bezeichnete Organismen, zeigen dieses Phänomen. Man kann durchaus sagen, daß tagesrhythmische Verhaltens- und Zustandsänderungen eine Eigenschaft aller Lebewesen sind. Kein Wunder also, wenn die Frage nach Eigenschaften und Ursachen dieser Schwingungen immer mehr an Bedeutung gewinnt. Eine der wichtigsten grundsätzlichen Fragen lautet: Kommen tagesrhythmische Phänomene dadurch zustande, daß die Organismen vom vorgegebenen Tag-Nacht-Wechsel und den damit verbundenen physikalischen Umweltsänderungen gesteuert werden, oder sind sie selbständig, auf Grund einer "Inneren Uhr", in der Lage, tagesperiodische Schwingungen auszuführen? Um diese Frage zu beantworten, hat man Tiere und Pflanzen unter möglichst konstanten Bedingungen untersucht. In den meisten Fällen war das Ergebnis eindeutig: Die tagesperiodischen Phänomene liefen weiter.

Derartige Tagesrhythmen, die unabhängig von erkennbaren äußeren Faktoren beibehalten werden, nennt man "frei laufende" Rhythmen (PITTENDRIGH, 1960). Sie haben eine typische Eigenschaft: Ihre Periodenlänge beträgt fast nie genau 24h, im allgemeinen liegt sie zwischen 21h und 26h. Ihr Durchschnittswert kann von Art zu Art, ja selbst von Individuum zu Individuum verschieden sein. Derartige Rhythmen, deren durchschnittliche Periodenlänge nur "circa" mit der eines Tages übereinstimmt, heißen auch "circadiane Rhythmen". In der Tatsache, daß die Periodenlänge der frei laufenden Rhythmen von 24 h abweicht, kann man ein Argument für ihre endogene Natur sehen (ASCHOFF, 1955). Unter normalen Bedingungen (also

in einer Umgebung, in der die Umwelteinflüsse nicht künstlich konstant gehalten werden), synchronisieren Ereignisse, die sich im 24-stündigen Rhythmus wiederholen, diese endogenen Rhythmen mit dem Tagesverlauf. Derartige Ereignisse heißen "Zeitgeber".

Geht die naturwissenschaftliche Forschung an neue, bisher nicht bearbeitete Fragenkomplexe heran, so kann man deren Erforschung oft grob in zwei Stufen einteilen: Die erste könnte man als "Sammelperiode", die zweite als "Analytische Periode" bezeichnen. Während der ersteren wird von den verschiedensten Seiten Material zusammengetragen, erst in der zweiten ist es möglich, die Analyse durch Vergleich zwischen den mittlerweile vorliegenden Einzelergebnissen und darauf aufbauenden Versuchen gezielt voranzutreiben.

Am gegenwärtigen Stand der Rhythmusforschung fällt auf, daß die "Sammelperiode" noch stark im Vordergrund steht. Der größte Teil der Veröffentlichungen bezieht sich darauf, wie sich das eine oder andere Tier oder der eine oder andere physiologische Prozess tagesrhythmisch verhält, der kleinere Teil fragt nach dem im Hintergrund stehenden zentralen Mechanismus, nach der "Inneren Uhr".

Man geht heute von der Annahme aus, daß frei laufende Rhythmen auf selbst regulierten Systemen basieren, das heißt, sie können Abweichungen von einem vorgegebenen Sollwert erkennen und sich selbst korrigieren (HASSENSTEIN, 1965; Zusammenfassung RENSING, 1973). Solche Systeme sind gegen Störungen von außen wenig anfällig. Das zeigen zwei Beispiele: Frei laufende Rhythmen sind - bezogen auf ihre Periodenlänge - sehr wenig temperaturempfindlich, ihre  $Q_{10}$ -Werte liegen zwischen 1,0 und 1,2, sie können sogar unter 1 liegen (SWEENEY und HASTINGS, 1960). Oder: Man kann den Energiehaushalt eines Tieres oder einer Pflanze fast völlig zum Erliegen bringen, die "Innere Uhr" läuft trotzdem weiter (WILKINS und WARREN, 1963).

Bei der Erforschung physiologischer Prozesse können Störungen wichtige Hinweise auf deren Mechanismus bringen; diese Störungen können entweder künstlich herbeigeführt werden (beispielsweise durch Strahlung) oder auf "natürlichen" Fehlern,

wie Mutationen, beruhen. Es ist also sinnvoll, nach Möglichkeiten zu suchen, wie tagesperiodische Prozesse in ihrem Ablauf gestört werden können.

Eine derartige Möglichkeit besteht darin, das System unter dem Einfluß chemischer Faktoren zu untersuchen. Derartige Experimente wurden schon von vielen Autoren durchgeführt. Neben der reinen Beobachtung der Störung ergibt sich bei diesen Versuchen ein weiterer Aspekt: Jede Droge hat ein mehr oder weniger gut bekanntes Wirkungsspektrum. Findet man eine Substanz, die den beobachteten Vorgang, in diesem Falle also einen circadianen Rhythmus, reproduzierbar ändert, so kann sich die Möglichkeit ergeben, aus der beobachteten Reaktion des Versuchstieres und dem Wirkungsspektrum der Droge Hypothesen über deren Angriffspunkt und damit über einen Mechanismus der "Inneren Uhr" aufzustellen.

Die bisher durchgeführten Versuche, die das Ziel hatten, frei laufende Rhythmen durch Drogen zu beeinflussen, wurden in erster Linie mit Pflanzen und Einzellern durchgeführt (BRUCE and PITTENDRIGH, 1960; BÜNNING, 1965; KARAKASHIAN and HASTINGS, 1960; SCHWEIGER, H.G. und SCHWEIGER, E., 1963; JEREBZOFF, 1965; BALL and DYKE, 1956). Relativ wenige Autoren verwendeten für derartige Versuche Metazoen (ENRIGHT, 1971; BODMAN, 1970; die Wirkung von Drogen auf Zeitdressur wurde von KALMUS (1954) und RENNER (1957) untersucht).

## B. Material und Methoden

Die Versuche wurden im Keller des Zoologischen Institutes durchgeführt. Dort stand mir ein Raum mit einer Grundfläche von  $4 \text{ m}^2$  zur Verfügung, in dem Licht und Temperatur geregelt werden konnten und Außengeräusche weitgehend abgeschirmt waren. Von früheren Versuchen in diesem Raum war bekannt, daß er gegen Schall nur begrenzt isoliert: Körperschall - also Schwingungen, die sich über Festkörper fortpflanzen - konnte von empfindlichen Tieren noch wahrgenommen werden.

Daraus ergab sich die Notwendigkeit, Versuchstiere zu wählen, die relativ geräuschunempfindlich sein sollten; außerdem sollten sie folgende Eigenschaften haben: Sie sollten im Wasser leben (die zu prüfende Droge kann dann leicht dem Medium in genau meßbarer Konzentration zugegeben werden); sie sollten leicht zu halten und ganzjährig zu beziehen sein; außerdem sollten sie aus mancherlei Gründen nicht zu klein sein, und schließlich sollte über ihr tagesrhythmisches Verhalten schon einiges bekannt sein. Diese Bedingungen werden von Flußkrebsen gut erfüllt. Nach anfänglichen Versuchen mit der einheimischen Art Orconectes (=Cambarus) limosus, die sich als empfindlich gegenüber Temperaturen über 25°C herausstellte (niedrige Temperaturen ließen sich im Versuchsraum nicht konstant halten), entschied ich mich für Astacus leptodactylus, den Galizischen Sumpfkrebs.

Die Tiere wurden aus dem Handel bezogen (Nordseehalle AG München), sie waren aus der Türkei importiert. Nach dem Kauf wurden sie in einem 300 l fassenden Aquarium gehalten, in dem auf einer Grundfläche von 0,75 m<sup>2</sup> bis zu etwa 20 Krebse lebten. Das Aquarium stand in einem mit Glas überdachten Raum und war damit den Lichtverhältnissen des Tag-Nacht-Wechsels ausgesetzt. Die Krebse hatten genügend Versteckmöglichkeiten. Ernährt wurden sie mit Hackfleisch (Fütterung jeden dritten Tag); zusätzlich wurden Tubifex und im Winter, wenn wenig Algen wuchsen, gekochter Salat gegeben. Das langsam fließende Wasser des Aquariums stammte aus der Zisterne des Zoologischen Institutes. Ein Zeichen dafür, daß diese Haltungsbedingungen den Krebsen zusagten, war, daß Jungtiere aus Eiern schlüpften und heranwuchsen.

Flußkrebse sind vorwiegend bei Nacht aktiv, am Tag halten sie sich meistens in ihren Schlupfwinkeln verborgen. Gelegentlich waren die Sumpfkrebse auch am Tag außerhalb ihres Verstecks zu sehen; die Laufaktivität war bei dieser Art nicht so ausschließlich auf die Dunkelperiode beschränkt wie bei Orconectes limosus.

Während eines Versuchs wurden die Krebse nicht gefüttert und das Wasser im Aktographen nicht gewechselt, um Störungen zu vermeiden. Vor Versuchsbeginn kamen die Tiere zwei bis drei Tage lang in Einzelbecken ("Eingewöhnungsbecken"), in denen sie ihren Darm weitgehend entleerten; diese Becken waren wie die Trommel des Aktographen (Siehe S.6 ) gebaut, um den Krebsen die Möglichkeit zu geben, sich an die neue Umgebung zu gewöhnen. Im Anschluß an diese Vorbereitungsstage kamen die Krebse in die Aktographen.

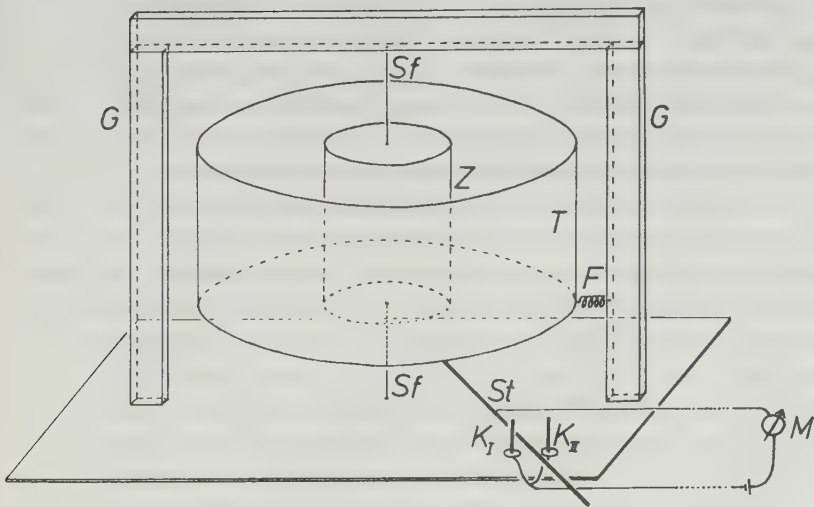


Abb. 1 : Aktograph. Die Aktivität wurde mit Hilfe eines beweglich aufgehängten Aquariums registriert. F= Feder, G= Gestell, K<sub>I</sub>, K<sub>II</sub>= Kontakte, M= Miniscript, Sf= Stahlfaden, St= Stab, T=Trommel, Z= Zylinder

Registrierung der Aktivität: Der Aktograph bestand aus einem an einem Stahlfaden (Sf) aufgehängten trommelförmigen Aquarium, das einen Durchmesser von 43 cm hatte (Abb. 1). Im Inneren einer großen Trommel (T) war zentriert ein kleiner Zylinder (Z) angebracht, an dessen Oberseite - wiederum zentral - der Stahlfaden ansetzte. Der Raum zwischen Trommelrand und Zylinder war unter Versuchsbedingungen mit 10 l Wasser gefüllt. In dieser ringförmigen Arena konnte sich ein Krebs ungestört bewegen; er konnte nicht nur in einer Richtung im Kreis laufen, sondern auch mühelos umkehren. Der Boden der Arena war mit einem Plastiknetz ausgelegt, da die Krebsbeine sonst auf dem glatten Kunststoffboden keinen Widerstand gefunden hätten. Während eines Versuchs mußte die Arena mit einem Deckel abgeschlossen sein, weil sich die Krebse als wahre Ausbruchskünstler erwiesen haben. Bewegte sich der Krebs, so erhielt das Aquarium einen Impuls in tangentialer Richtung und begann, um die durch den Stahlfaden gegebene Achse zu schwingen. Diese Bewegung wurde durch eine kleine Feder (F) zwischen Trommel und Gestell (G) begrenzt, das Aquarium konnte also nur zwischen zwei Stellungen hin- und herpendeln. Ein an der Trommel befestigter Stab (St) berührte dabei abwechselnd einen von zwei seitlich angebrachten Metallstiften (K). Jeder Kontakt löste einen Zählimpuls aus. Als Registriergeräte dienten Miniscript-Schreiber, die außerhalb des Versuchsraumes in einem Beobachtungsraum aufgestellt waren. Der Aktograph war durch Veränderung des Abstandes der beiden Kontakte in seiner Empfindlichkeit variierbar. Das Wasser im Aktographen wurde während des Versuches belüftet, eine Filterung hat sich nicht bewährt.

Auswertung der Aufzeichnungen: Für die endgültige Versuchsauswertung waren die Registrierstreifen nicht geeignet. Jede Berührung zwischen Stab und Kontakt wurde als Strich aufgezeichnet; diese Striche lagen oft so dicht nebeneinander, daß sie nicht ausgezählt werden konnten. Damit war die Aktivität nicht eindeutig quantifizierbar. Bei der endgültigen Auswertung wurde folgendermaßen verfahren (z.B. Abb. 2): Die Aktivität wurde, wie üblich, in ein Schema von untereinander liegenden Versuchstagen eingetragen. Als Klassengröße für die über 24 h verteilte Akti-

vität wurde 15 min gewählt. Ein bis fünf Miniscriptausschläge pro 15 min wurde als niedriger Block, mehr als 5 Ausschläge pro 15 min wurde als hoher Block dargestellt. War ein Krebs mehrere Viertelstundeneinheiten nacheinander aktiv, so entstand ein zusammenhängendes Aktivitätsband. Außerdem sind in der Darstellung die Lichtverhältnisse im Versuchsraum eingetragen: Ein schwarzer Balken unter der Aktivitätsaufzeichnung kennzeichnet Dunkelheit, ein heller Licht.

Bedingungen im Versuchsraum: Im Versuchsraum (S.3) waren 7 Aktographen aufgestellt. Nach dem mehrtägigen Aufenthalt im "Eingewöhnungsbecken" (S.5) kam je ein Krebs in einen Aktographen (1. Versuchstag). Das Wasser stammte aus der Zisterne oder - bei späteren Versuchen - aus der Leitung. Die Temperatur im Versuchsraum betrug 25°C, maximale Abweichungen 2°C. Weder Intensität noch Dauer dieser Abweichungen waren mit dem Tagesverlauf korreliert.

Während der ersten drei Tage im Aktographen wurde ebenso wie während der Zeit im "Eingewöhnungsbecken" ein Hell-Dunkel-Wechsel mit einer Periodenlänge von 24 h geboten. Vom dritten Versuchstag an wurde Dauerdunkel, und zwar absolute Dunkelheit, beibehalten; während der Helligkeitsphase lag, da die Lauftrommeln nicht gleichmäßig ausgeleuchtet waren, die Lichtintensität zwischen 180 und 260 Lux. Als Lichtquellen dienten zwei Leuchtstoffröhren. Die Dauer von Helligkeits- und Dunkelperiode ist den Abbildungen zu entnehmen.

### C. Das ungestörte Aktivitätsverhalten bei L/D und D/D

Bevor ich die Wirkung von Drogen auf das tagesrhythmische Verhalten von Astacus leptodactylus untersuchen konnte, war es nötig, die ungestörte Aktivitätsverteilung der Tiere kennenzulernen.

#### 1) Ein typisches Aktogramm

Abb. 2 stellt das Aktogramm eines Krebses dar, dessen circadiane Aktivitätsrhythmik in D/D deutlich ausgeprägt war. In den ersten drei Versuchstagen, an denen ein L/D 12:12 h-Rhythmus geboten wurde, lag, wie zu erwarten, die Hauptaktivität in den Dunkel-

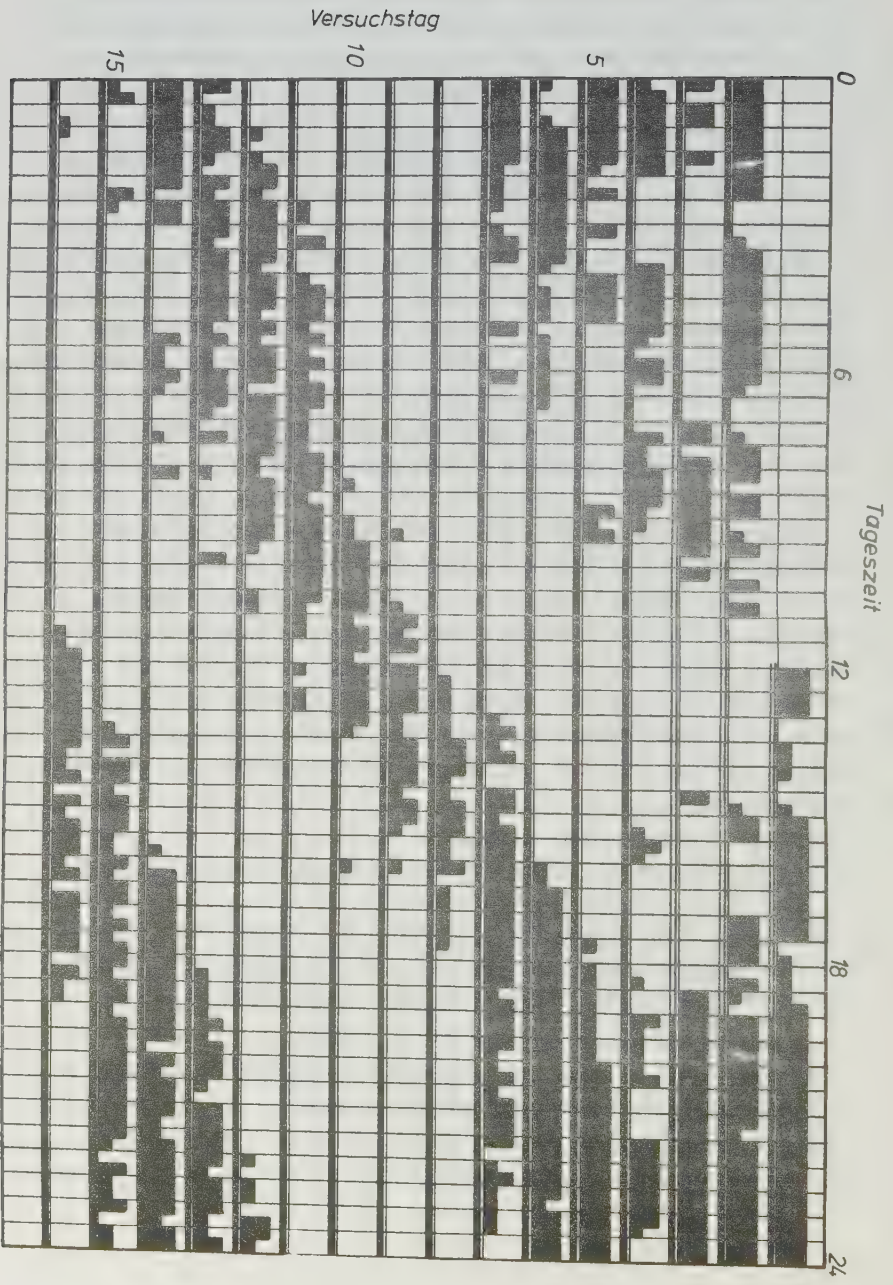


Abb. 2 : Aktoogramm eines Flußkrebeses

phasen. Die Aktivität zu einem bestimmten Zeitpunkt läßt sich aber keineswegs ausschließlich als Reaktion auf die zu diesem Zeitpunkt herrschenden Helligkeitsverhältnisse verstehen; sie war keineswegs über die Dunkelphase regelmäßig verteilt, noch trat sie ausschließlich während dieser auf. Sowohl am zweiten wie auch am dritten Versuchstag lag der Aktivitätsbeginn vor Licht-Aus. (Am ersten Versuchstag war das tagesrhythmische Verhalten durch das Einsetzen in den Aktographen gestört). Zu Beginn jeder der drei Dunkelphasen war das Tier sehr aktiv, gegen ihr Ende nahm die Aktivität wieder ab und sank auf den Ruhewert, um dann bei Licht-Ein wieder kurz anzusteigen. In der Mitte der Helligkeitsphasen war der Krebs fast nicht aktiv.

Vom dritten Versuchstag an entfällt der als Zeitgeber wirkende Hell-Dunkel-Wechsel; der nun frei laufende Rhythmus folgt der Eigenfrequenz der "Inneren Uhr". Die Periodenlänge liegt im abgebildeten Beispiel bei 20 h 40 min. Als "Periodenlänge" bezeichne ich die Zeit zwischen einem Aktivitätsbeginn und dem nächsten.\* Der Versuch wurde am 17. Versuchstag beendet.

## 2) Zusammenfassung weiterer Eigenschaften des Aktivitätsmusters bei L/D und D/D

Die folgenden Ergebnisse sind aus den Resultaten von 43 Versuchen zusammengefaßt. (Diesen 43 für die Auswertung geeigneten Versuchen stehen 84 Versuche gegenüber, bei denen die Krebse keine oder nur wenige Perioden andauernde tagesrhythmische Aktivitätsmuster gezeigt haben).

### a) Periodenlängen

Die durchschnittlichen Periodenlängen der einzelnen Tiere können stark voneinander abweichen; das ist zusammenfassend in Abb. 3 dargestellt. Sie liegen zwischen 21 h und 23 h. (Um ein möglichst homogenes Ausgangsmaterial zu haben, wurden die meisten Versuche mit Männchen durchgeführt).

---

\* Vergleicht man die Schwankungen von Aktivitätsbeginn, Aktivitätsmittelpunkt und Aktivitätsende um den jeweiligen Mittelwert, so zeigt sich, daß der Aktivitätsbeginn etwas genauer als der Mittelpunkt und signifikant genauer ( $p < 0,01$ ) als das Aktivitätsende eingehalten wird. Diesen Werten liegen die Ergebnisse von 43 Versuchen zu Grunde. Die "Durchschnittliche Periodenlänge" ist das arithmetische Mittel aus den Einzelwerten eines Versuchs.

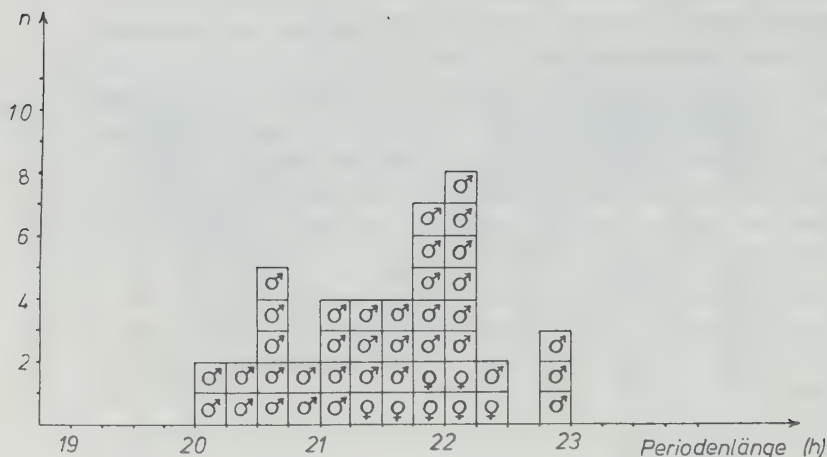


Abb. 3 : Durchschnittswerte der Periodenlängen frei laufender Rhythmen (43 Versuche).

#### b) Transients und Varianz der Periodenlänge in D/D

Die Länge der aufeinanderfolgenden Perioden schwankt um einen für jedes Tier charakteristischen Mittelwert  $\bar{\tau}$ ; die Abweichungen liegen im Bereich von  $\bar{\tau} \pm 2h$ . In Abb. 4 ist das Streuen der Periodenlänge um einen aus 9 Perioden bestimmten Mittelwert dargestellt.

In Abb. 5 sind auf die gleiche Weise die Werte von 43 Versuchen wiedergegeben. Auch hier ist als Bezug die durchschnittliche Periodenlänge jedes einzelnen Krebses gewählt. (Vom 7. Tag an nimmt die Anzahl der Werte ab, weil von diesem Tag an viele Versuche unter Drogeneinfluß weiterliefen und damit hier nicht berücksichtigt werden können). Es fällt auf, daß die Periodenlänge der meisten Tiere am ersten Tag in Dauerdunkel über dem Mittelwert lag ( $p < 0,01$ ). Diese deutliche Abweichung vom Mittelwert war zu erwarten: Wenn sich biologische Rhythmen von einer Periodenlänge auf eine andere umstellen (in dem Fall von der Frequenz des mit einem vorgegebenen 24 h - Rhythmus synchronisierten auf den frei laufenden Rhythmus), so geschieht diese Umstellung nicht abrupt, vielmehr sind Übergangszyklen, sogenannte Transients, dazwischengeschaltet (WEVER, 1962).

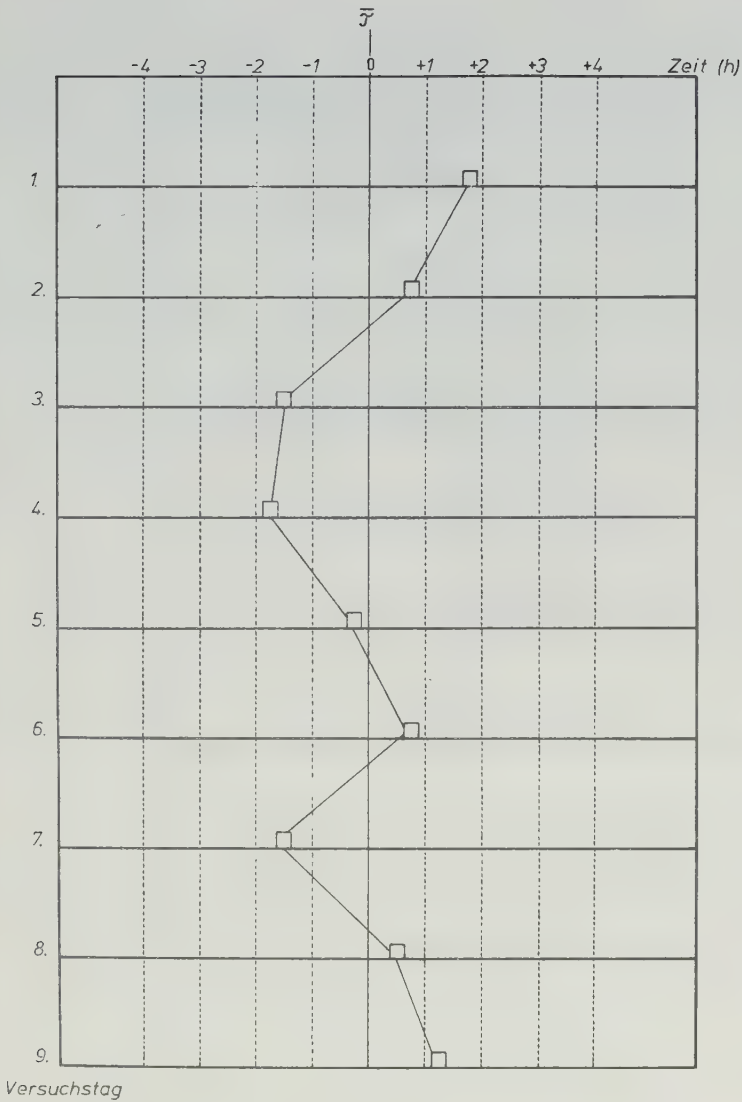


Abb. 4 : Varianz der Periodenlängen eines frei laufenden Rhythmus um den individuellen Mittelwert  $\bar{\tau}$ .

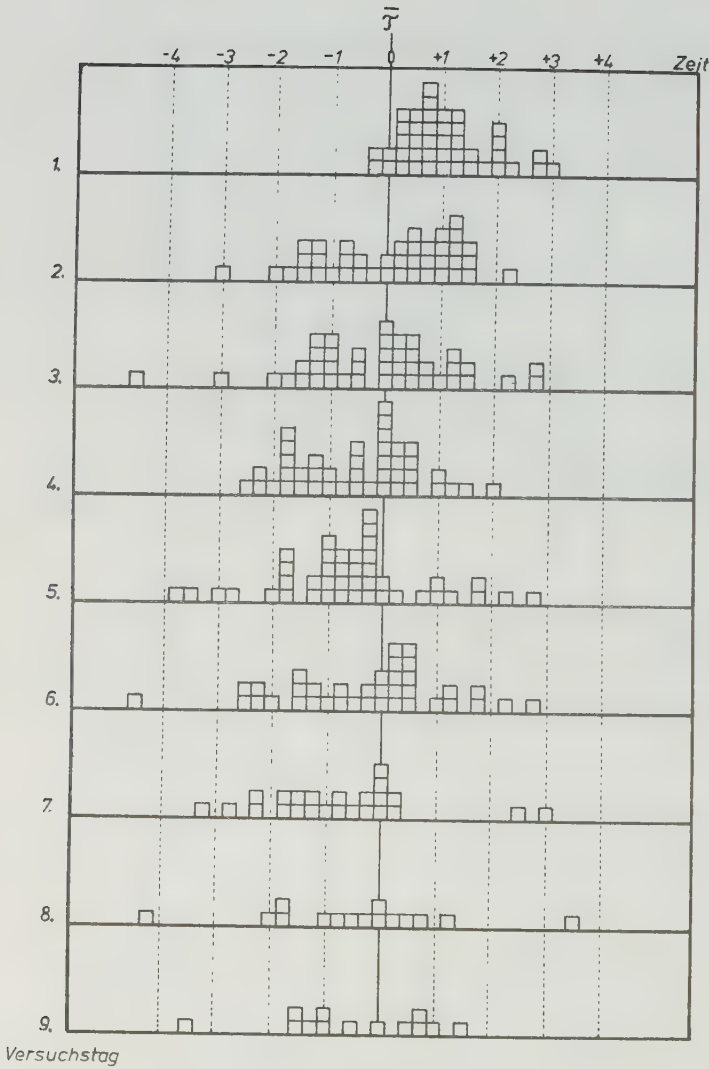


Abb. 5 : Zusammenfassende Darstellung der Varianzen um die individuellen Mittelwerte  $\bar{x}$  von 42 Periodogrammen.

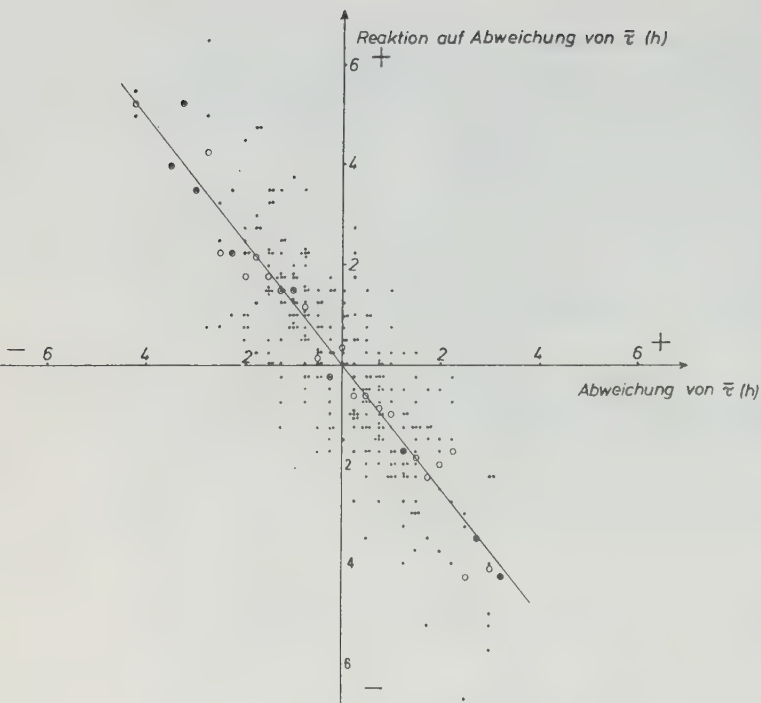
Die Varianzen der Periodenlängen um  $\bar{\tau}$  ändern sich vom zweiten Tag in D/D an nicht mehr signifikant ( $p > 0,05$ ); die Eigenfrequenz wird also vom zweiten Tag in D/D an mit gleich bleibender Genauigkeit während der restlichen Versuchsdauer eingehalten.

c) Reaktion auf starke Abweichungen der Periodenlänge vom Mittelwert.

In Abb. 5 sind zusammenfassend die Schwankungen der Perioden um  $\bar{\tau}$  dargestellt. Die einzelnen Perioden weichen teilweise über drei Stunden nach Plus oder Minus von  $\bar{\tau}$  ab. Wie eingangs (S.2) erwähnt, handelt es sich bei circadianen Rhythmen um selbstregulierte Systeme, sie können Abweichungen von einem Sollwert registrieren und korrigieren. Unter diesem Aspekt ist die Frage naheliegend, ob auf eine starke Abweichung vom Sollwert - das ist in diesem Fall die individuelle Periodenlänge - eine Reaktion folgt, die diese Abweichung wieder ausgleicht.

Um das zu prüfen, habe ich die frei laufenden Rhythmen in folgender Darstellungsweise zusammengefaßt: Bei je zwei aufeinander folgenden Perioden wurden die Abweichungen von  $\bar{\tau}$  miteinander verglichen. Die Abweichung von  $\bar{\tau}$  jeder Periode wurde gegen die der folgenden Periode aufgetragen; auf diese Weise entstand die Punkteschar von Abb. 6a. Für die Darstellung wurden alle Werte unbeeinflusster frei laufender Rhythmen mit Ausnahme der Transients verwendet.

Es zeigt sich, daß die Punkte nicht zufallsgemäß um den Nullpunkt verteilt sind. Durch die Punkteschar läßt sich eine Gerade ( $p < 0,01$ ) legen, die den Ursprung schneidet und in einem Winkel von  $52^\circ$  zur Ordinate im zweiten und dritten Quadranten liegt. Es besteht also eine Beziehung zwischen den Längen aufeinanderfolgender Perioden: Auf eine Periode, deren Dauer von  $\bar{\tau}$  stark abweicht, folgt mit großer Wahrscheinlichkeit eine Periode, die reziprok verlängert oder verkürzt ist; auf eine stark negative Abweichung folgt mit hoher Wahrscheinlichkeit eine positive Abweichung und umgekehrt. ( Die Einzelperioden können theoretisch auf zwei verschiedene Weisen um  $\bar{\tau}$  schwanken: Auf jede positive Abweichung von  $\bar{\tau}$  kann eine negative Reaktion folgen, andererseits können auf mehrere gleichgerichtete Abweichungen mehrere reziprok veränderte Perioden folgen. Abb. 6b zeigt beide Möglichkeiten.)



bb. 6a : Abweichungen von  $\bar{\tau}$  an aufeinanderfolgenden Tagen.

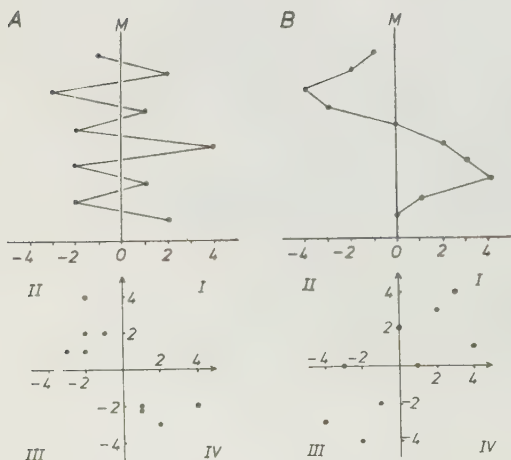


Abb. 6b: Erläuterung zu Abb. 6a. Prinzipiell sind zwei Möglichkeiten denkbar, wie die Schwankungen um  $\bar{\tau}$  verlaufen können (A,B). Beide Typen sind in der auf die Periodenlängen angewandten Darstellungsweise abgebildet; beim Beispiel A liegen die Punkte in den Quadranten II und IV, bei B in I und III. Die Regelung der Periodenlänge folgt also bei größeren Abweichungen von  $\bar{\tau}$  (mehr als 3h) dem Typ A, nicht B.

d) Aktivitätsbeginn bei Licht-Aus

Bei dem auf S. 7 beschriebenen Einzelaktogramm fiel der Beginn der Hauptaktivität nicht mit Licht-Aus zusammen, vielmehr war er vorverlegt. Neben derartigen Vorverlegungen traten auch Fälle auf, bei denen die Aktivität erst nach Licht-Aus einsetzte; der vorgegebene Hell-Dunkel-Wechsel synchronisierte den endogenen Rhythmus nur mit begrenzter Genauigkeit. Endogener Aktivitätsrhythmus und vorgegebener Hell-Dunkelwechsel konnten also um einen positiven oder um einen negativen Phasenwinkel verschoben sein. (Eine Phasenwinkeldifferenz wird als negativ bezeichnet, wenn die Eigenfrequenz der synchronisierten Schwingung größer als die der synchronisierenden Schwingung ist, im umgekehrten Fall wird sie als positiv bezeichnet).

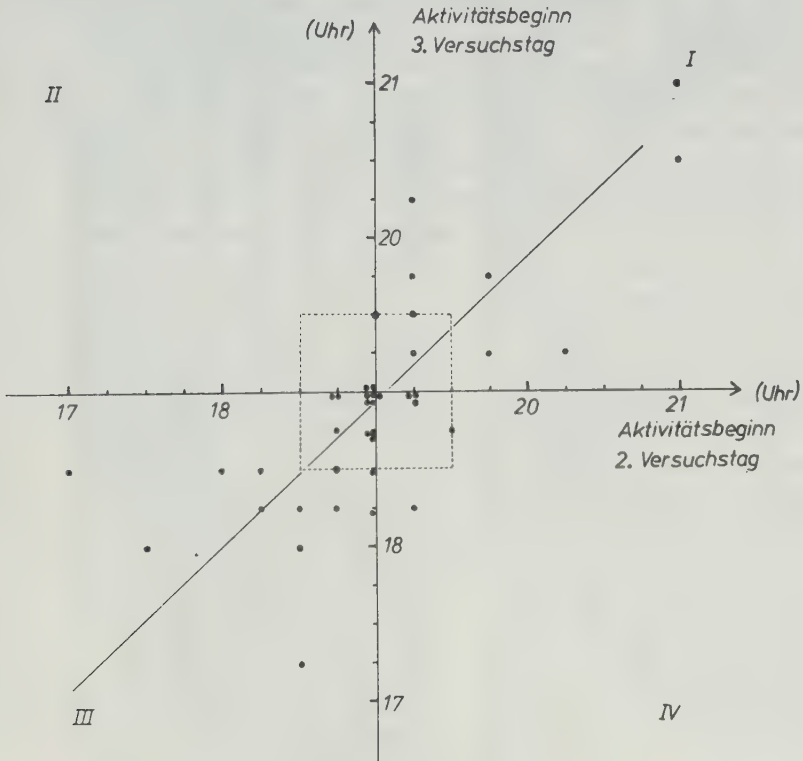


Abb. 7 : Aktivitätsbeginn von 39 Krebsen bei L/D am 2. und 3. Versuchstag.

In Abb. 7 ist aufgetragen, wann bei den ausgewerteten Versuchen am 2. und 3. Versuchstag die Aktivität - bezogen auf Licht-Aus (19 Uhr) - einsetzte. Es zeigt sich, daß positive und negative Phasenwinkeldifferenzen im Bereich von 2 h vor und nach Licht-Aus liegen und etwa gleich häufig auftreten. Die Punkte liegen, von zwei Ausnahmen abgesehen, in den Quadranten 1 und 3. (Die Regressionsgerade läßt sich mit  $p < 0,01$  absichern). Daraus ist zu entnehmen, daß ein Krebs, der am zweiten Versuchstag vor Licht-Aus mit seiner Aktivität begonnen hat, mit großer Wahrscheinlichkeit auch am dritten Versuchstag den Aktivitätsbeginn vorverlegen wird; umgekehrt wird er die Tendenz, den Aktivitätsbeginn nach Licht-Aus zu verlegen, an beiden Tagen beibehalten.

e) Weiterlaufender Licht-Ein-Peak und zusammenfassendes Periodogramm

Wie bereits erwähnt (S.9), ist das Aktivitätsmuster bei L/D biphasisch, neben der Hauptaktivität in der Dunkelphase kann ein Nebenmaximum nach Licht-Ein auftreten. Ein derartiges Verhalten von Flußkrebsen beschreiben auch andere Autoren (PAGE and LARIMER, 1972). Erstaunlicherweise erschien der Aktivitätspeak nach Licht-Ein bei meinen Versuchen bei einigen Tieren im anschließenden D/D wieder.

Dieser weiterlaufende Licht-Ein-Peak unterscheidet sich in mehreren Punkten vom "normalen" frei laufenden Rhythmus, der Fortsetzung der Hauptaktivität in D/D. Zum einen ist die Aktivitätsdauer geringer, sie beträgt höchstens 1,5 h. (Die Hauptaktivität hält vergleichsweise bis zu 8 h an). Ein zweiter Punkt, in dem sich die Rhythmen unterscheiden, ist, daß sich die Fortsetzung des Licht-Ein-Peaks in Dauerdunkel höchstens 3 Perioden lang beobachten läßt, in den meisten Fällen war sie nach ein bis zwei Tagen erloschen. Am erstaunlichsten aber war, daß die Periodenlänge des weiterlaufenden Licht-Ein-Peaks im Gegensatz zur frei laufenden Hauptaktivitätsperiode nahe bei 24 h lag.

Zwei Beispiele dieses weiterlaufenden Licht-Ein-Peaks sind in Abb. 8 dargestellt. Bei den 43 ausgewerteten Versuchen trat er in 16 Fällen auf. In 5 Fällen war er eine Periode, in 8 Fällen zwei Perioden und in drei Fällen drei Perioden lang zu erkennen.

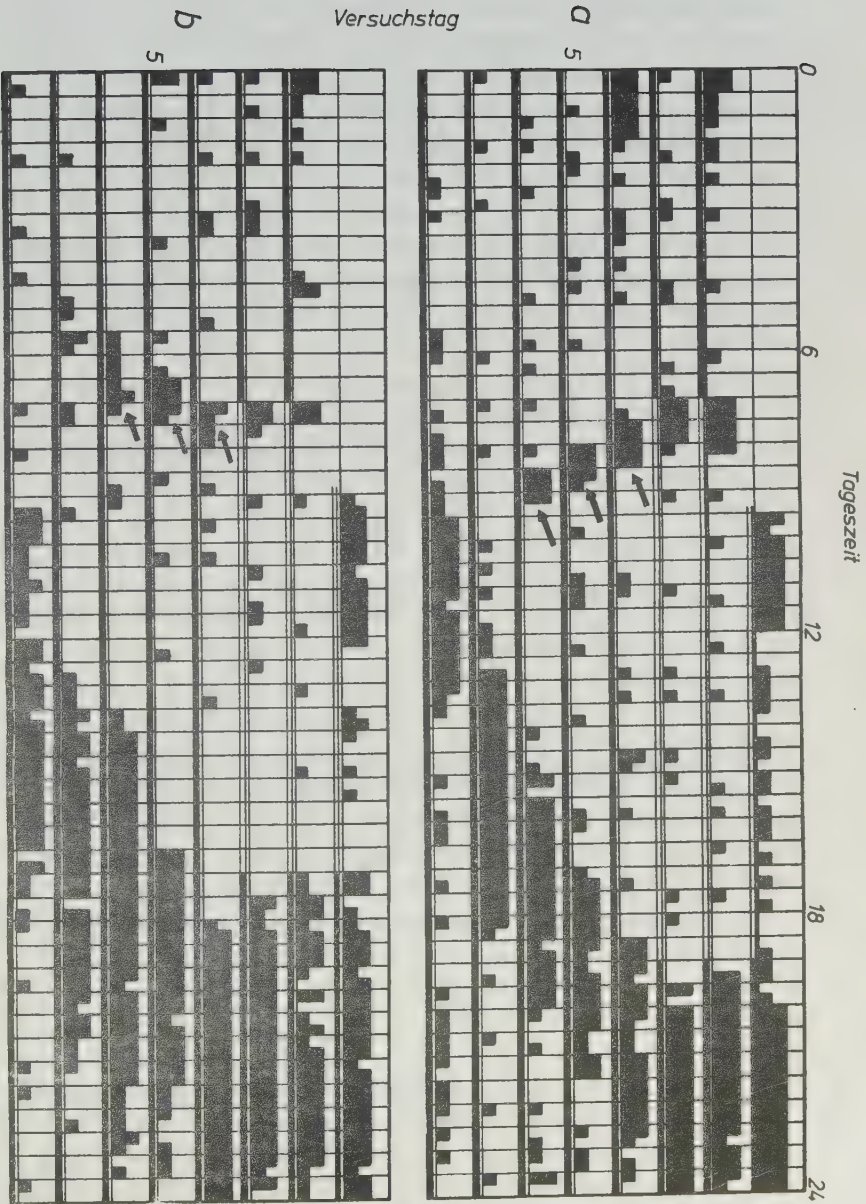


Abb. 8 : Der Licht-Ein-Peak und seine Fortsetzung in D/D<sub>0</sub>. Zwei Beispiele für die Fortsetzung des Licht-Ein-Peaks in D/D<sub>0</sub> sind abgebildet (Pfeile), von denen eines (Abb. 8a) eine Periodenlänge von

Um auszuschließen, daß es sich bei diesem Rhythmus um ein Zufallsprodukt handelt, das dadurch entstanden ist, daß einzelne Aktivitätsausbrüche während der Ruhephase zufällig untereinander liegen und dadurch besonders ins Auge fallen, wurde ein zusammenfassendes Periodogramm aller 43 Versuche angefertigt (Abb. 9). Der Aktivitätsverlauf dieser Summendarstellung folgt, in groben Zügen, dem auf S. 7 beschriebenen tagesrhythmischen Verhalten eines Einzeltieres. Das Aktivitätsniveau steigt - während der ersten drei Versuchstage - zu Beginn der Dunkelphase an, erreicht sein Maximum, sinkt wieder ab und liegt während der Helligkeitsphase nahe bei Null. Deutlich tritt am zweiten und dritten Versuchstag ein Peak bei Licht-Ein hervor: Das Niveau steigt sprunghaft an, um sofort wieder abzusinken. Im Vergleich dazu ist der Anstieg bei Licht-Aus langsam und setzt, wie vor allem am dritten Tag zu sehen ist, bereits vor Licht-Aus ein. Vom 4. bis zum 7. Tag verschiebt sich der große "Aktivitätsberg" des nun frei laufenden Rhythmus unter gleichzeitiger Abflachung (der Zeitpunkt des Aktivitätsbeginns ist nicht mehr durch L/D synchronisiert und liegt damit bei den einzelnen Tieren bei verstärkt voneinander abweichenden Tageszeiten) in die Mitte der Darstellung. Außerdem ist aber am 4. und 5. Tag der weiterlaufende Licht-Ein-Peak deutlich zu erkennen. Auch hier hat der Wegfall des Zeitgebers (in dem Fall Licht-Ein) zur Folge, daß die Kurve weniger steil ansteigt. Am 4. und 5. Tag weicht die Periodenlänge dieses Peaks stärker als an den Tagen vorher von 24 h ab. Die Tatsache, daß der Aktivitätsbeginn bei den einzelnen Tieren teilweise vor, in stärkerem Maße aber nach dem Licht-Ein-Zeitpunkt liegt, hat ein Abflachen des Peaks und eine schwache Verschiebung auf die Mitte der Abbildung hin zur Folge.

Das zusammenfassende Periodogramm zeigt den weiterlaufenden Licht-Ein-Peak also ebenso wie die Einzeldarstellungen, es handelt sich um kein bei der Auswertung entstandenes Artefakt.

#### f) Häutung

Abschließend soll noch erwähnt werden, daß bei drei Versuchen eine Häutung während der Versuchszeit erfolgte. In allen Fällen sank die Aktivität mehrere Tage lang fast auf Null, stieg danach aber wieder an; ein tagesrhythmisches Aktivitätsmuster war dann in keinem der Fälle mehr zu erkennen. Der genaue Termin der Häutung läßt sich nicht festlegen; daß sie erfolgt ist, bezeugen die Exuvien, die sich nach dem Versuch im Aktographen fanden.

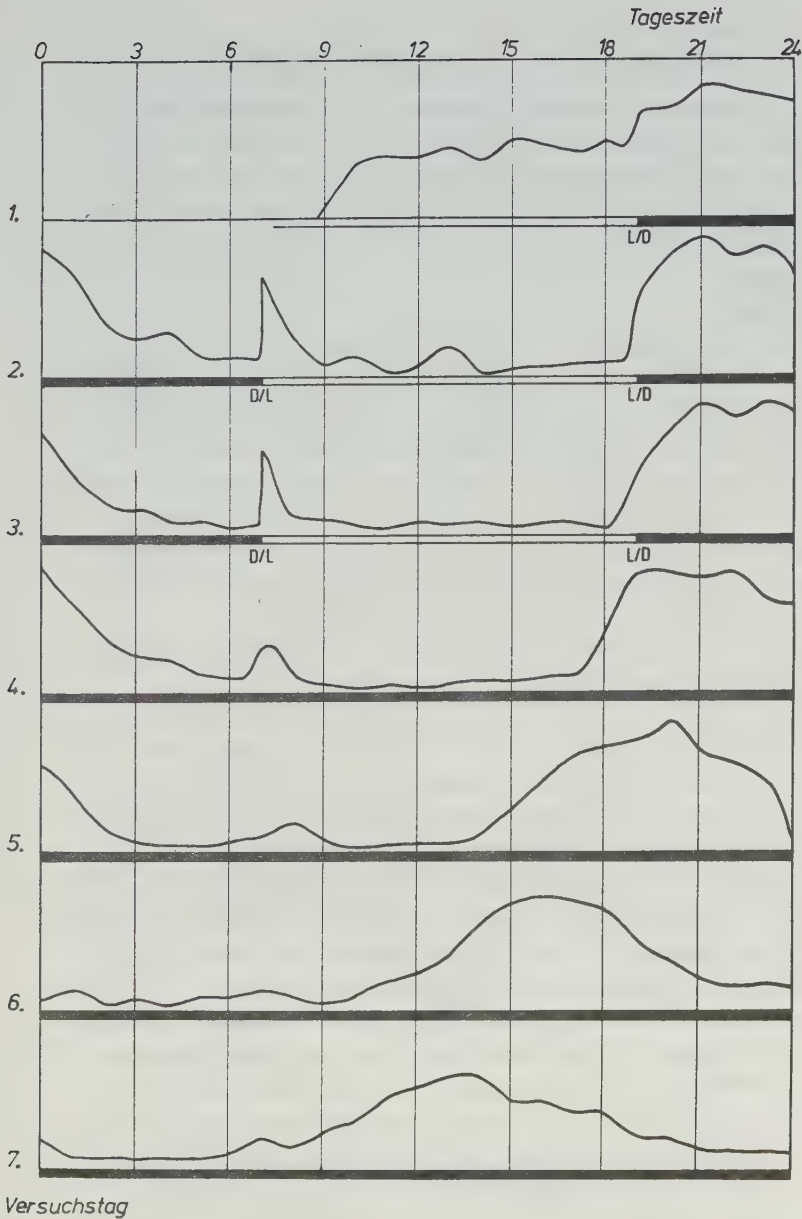


Abb. 9 : Zusammenfassendes Periodogramm. Die Aktogramme von 43 Versuchen sind zusammengefaßt. Bei D/D ist nicht nur der frei laufende Rhythmus (die Fortsetzung der Hauptaktivität in D/D) zu erkennen, sondern auch der weiterlaufende Licht-Ein-Peak.

### 3) Diskussion

Die Tatsache, daß die Periodenlänge frei laufender Rhythmen von 24 h abweicht, wird als Argument für deren Endogenität angesehen (S.1). Gemäß dieser Argumentation läßt sich aus der Tatsache, daß die circadianen Rhythmen eine in D/D von 24 h abweichende Periodenlänge zeigen, schließen, daß im Versuchsraum kein Zeitgeber mehr wirksam war, daß vielmehr die Eigenfrequenz des endogenen Oszillators im frei laufenden Rhythmus zum Ausdruck kam.

Bei einer Versuchsserie waren 7 Aktographen gleichzeitig in Betrieb (S.7). Es war denkbar, daß die durch die Aktivität der Krebse verursachten Laufgeräusche auf die frei laufenden Rhythmen der einzelnen Tiere eine synchronisierende Wirkung ausüben würden ("Soziale Zeitgeber" sind bekannt, ZUSF. HOFFMANN, 1970). Das war offensichtlich nicht der Fall, weil sich die Periodenlängen der frei laufenden Rhythmen von Krebsen ein und derselben Versuchsserie unterschieden; sie waren nicht signifikant ähnlicher als die von Tieren aus verschiedenen Serien.

Die meisten Schwierigkeiten bereitet eine Erklärung des weiterlaufenden Licht-Ein-Peaks. Andere Autoren (BLISS and SPRAGUE, 1958) beschrieben zwar bei Dekapoden ebenfalls einen Aktivitätsanstieg nach Licht-Ein, über ein Weiterlaufen im anschließenden D/D wird aber nirgends berichtet. Es bieten sich zwei prinzipiell verschiedene Erklärungsmöglichkeiten an: Entweder ist ein nicht ausgeschlossener Zeitgeber die Ursache der weiterlaufenden Licht-Ein-Peaks, oder es handelt sich um einen endogenen Rhythmus. Hier sollen diese beiden Alternativen nur aufgezeigt werden; eine ausführliche Diskussion erfolgt im Zusammenhang mit weiterführenden Versuchen auf S.40.

Von vielen Tieren ist bekannt, daß Aktivitätsbeginn und Zeitgeber nicht exakt, sondern innerhalb eines gewissen "Ziehbereiches" (HOFFMANN, 1963) synchronisiert sind. ASCHOFF und WEVER (1962) und HOFFMANN (1963) beschreiben eine Beziehung zwischen der Phasenwinkeldifferenz bei L/D und der Periodenlänge bei frei laufenden Aktivitätsrhythmen von Eidechsen bzw. Vögeln; eine derartige Korrelation war bei den hier beschriebenen Versuchen nicht feststellbar.

#### D. Der frei laufende Rhythmus unter dem Einfluß von Drogen

Da die Spontanfrequenzen bei meinen Versuchstieren individuell verschieden sind (S.9 ), war es in jedem Fall notwendig, zunächst das ungestörte tagesrhythmische Verhalten des Versuchstieres zu kennen. Darum wurde bei jedem Drogenversuch zuerst mindestens 4 Tage lang der frei laufende Rhythmus aufgezeichnet, bevor die Droge appliziert wurde. Ein kleines Zusatzgerät ermöglichte, die Droge ins Aktographenwasser laufen zu lassen, ohne den Versuchsraum betreten zu müssen (Abb. 10). Die Applikation erfolgte immer zu Beginn einer Aktivitätsphase. In Vorversuchen wurde die Drogenverträglichkeit der Krebse getestet. Untersucht wurde die Wirkung von Äthanol, Kochsalz, Isopropanol, Theobromin, Theophyllin und Coffein.

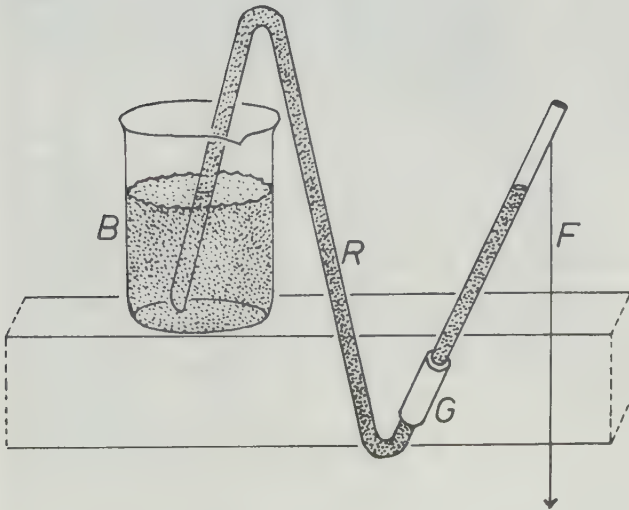


Abb. 10 : Drogenapplikation. Die Droge ist in Wasser gelöst in einem Becherglas (B) enthalten, das auf dem Gestell des Aktographen über dem Aquarium steht. Ins Becherglas reicht ein Z-förmiges Rohr (R), dessen freier Schenkel über ein Gummistück (G) durch Zug an einem Faden (F) nach unten geschwenkt werden kann. Der Faden reicht aus dem Versuchsraum hinaus. Der Versuchsraum muß zur Drogenzugabe nicht betreten werden.

## 1) Wirkung der Drogen

### Äthanol:

Zwei Chemikalien sind dafür bekannt, daß sie die Perioden frei laufender Rhythmen verlängern können, nämlich Schweres Wasser und Äthanol. Diese Wirkung wurde an Organismen der unterschiedlichsten systematischen Stellung untersucht (BÜNNING und BALTES, 1962; BÜNNING, 1960; KELLER, 1960; ENRIGHT, 1971; PITTENDRIGH et al, 1976). Bei meinen ersten Drogenversuchen wollte ich eine Substanz verwenden, deren Wirkung auf Metazoen, möglichst auf Crustaceen, bereits bekannt war; da ENRIGHT mit Äthanol an Isopoden gearbeitet hatte, bot sich diese Droge an.

13 Tiere haben insgesamt 108 Tage lang unter dem Einfluß von Äthanol frei laufende Rhythmen gezeigt. Das Medium enthielt die Droge in Konzentrationen von 0,25%, 0,5% 1% und 1,5%.

In 0,25%igem Äthanol hat sich die Periodenlänge nicht signifikant geändert (3 Versuche,  $p > 0,05$ ). Die einzige erkennbare Wirkung der Droge bestand darin, daß die Aktivitätsdauer der Periode, zu deren Beginn Äthanol appliziert worden war, im Vergleich zu den Perioden vor und nach der Drogenapplikation verlängert war. Die Periodenlänge blieb davon unbeeinflusst.

In 0,5%igem Äthanol trat bei allen Versuchen eine Periodenverlängerung auf. Ein typisches Versuchsergebnis ist in Abb. 11 dargestellt. Die Droge wird am 9. Versuchstag um 19<sup>00</sup> appliziert. Der Krebs reagiert darauf mit Daueraktivität, die eine Periode lang anhält und ohne Ruhephase in die Aktivitätszeit der nächsten Periode übergeht. Vom 11. Versuchstag an ist der frei laufende Rhythmus wieder klar zu erkennen. Nun zeigt sich die Periodenverlängerung: Die Frequenz ist deutlich verändert. In Tab. 1 sind die Ergebnisse von 6 Versuchen zusammengefaßt; der Unterschied zwischen den Werten von  $\bar{\tau}$  vor und nach der Applikation läßt sich mit  $p < 0,05$  absichern (t-Test für gepaarte Mittelwerte, Wilcoxon- Rang- Test).

Tab. 1 Durchschnittliche Periodenlänge in Normalmedium und in 0,5%igem Äthanol

| Vers.-Nr. | $\bar{\tau}(h)$ vor Drogenappl. | $\bar{\tau}(h)$ nach Drogenappl. |
|-----------|---------------------------------|----------------------------------|
| A 29      | 21,75 $\pm$ 1,31                | 22,56 $\pm$ 3,30                 |
| A 39      | 21,11 $\pm$ 2,46                | 21,37 $\pm$ 1,23                 |
| A 34      | 21,0 $\pm$ 1,55                 | 21,91 $\pm$ 2,58                 |
| A A       | 21,45 $\pm$ 1,51                | 22,85 $\pm$ 1,08                 |
| A 45      | 21,85 $\pm$ 1,93                | 22,75 $\pm$ 1,12                 |
| A 17      | 21,52 $\pm$ 2,17                | 23,20 $\pm$ 1,56                 |

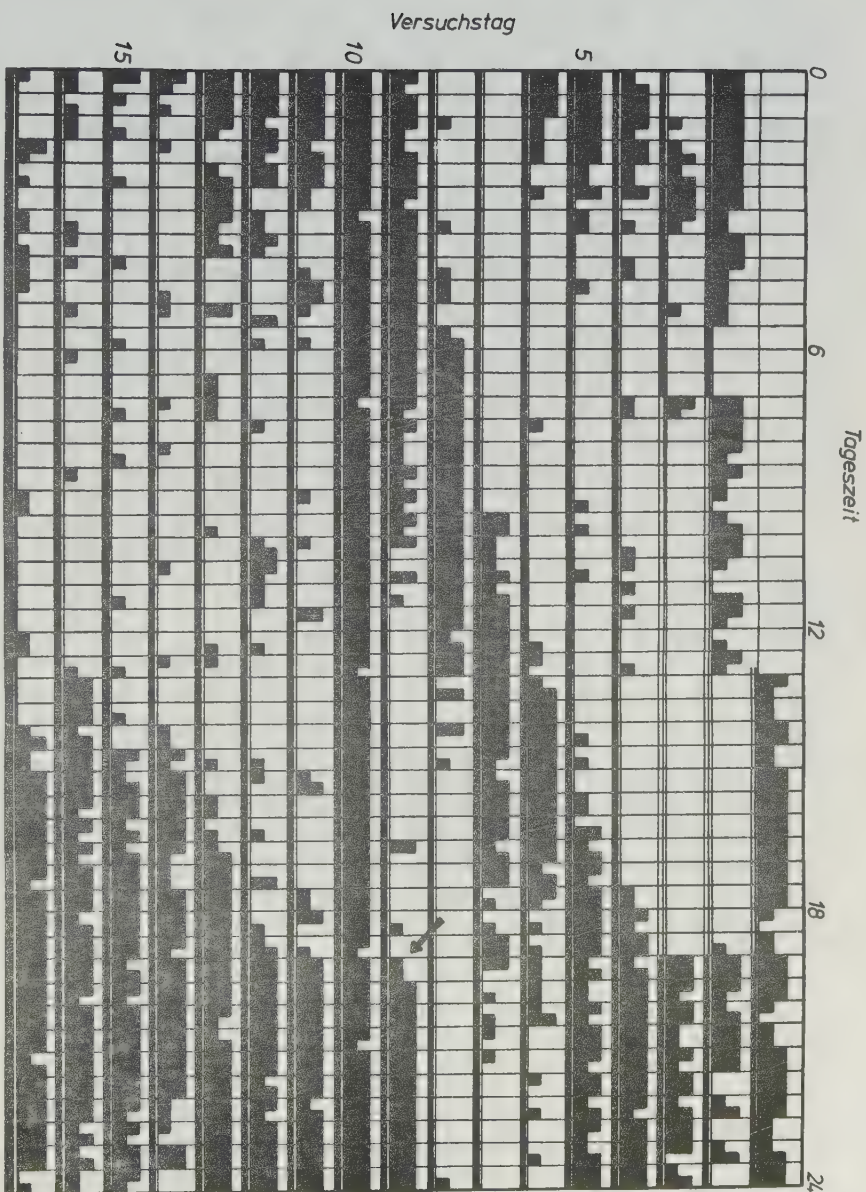


Abb. 11 : Wirkung von Äthanol auf den frei laufenden Rhythmus. Am 9. Tag um 19.00 (Pfeil) wird Äthanol appliziert (Konzentration im Aktographenwasser: 0,5%).  $\bar{x}$  betrug vor der Applikation 21h 52min, danach 23h 20min.

Der Aktivitätsbeginn setzt in 0,5%igem Äthanol nicht weniger genau ein, die Periodenlängen variieren nicht stärker als vor der Drogenzugabe ( $p > 0,05$ ). Eine schwache Aktivitätssteigerung, wie im Beispiel von Abb. 11 zu sehen, trat nur bei 2 von diesen 6 Versuchen auf. Die Aktivitätsdauer nach der Applikation war in allen Fällen erhöht.

4 weitere Versuche wurden in 1%igem Äthanol durchgeführt, die Ergebnisse zeigt Tab. 2.

Tab. 2 Durchschnittliche Periodenlängen in Normalmedium und in 1%igem Äthanol

| Vers.-Nr. | $\bar{\tau}$ (h) vor Drogenappl. | $\bar{\tau}$ (h) nach Drogenappl. |
|-----------|----------------------------------|-----------------------------------|
| 35        | 21,87 $\pm$ 0,78                 | 23,33 $\pm$ 2,05                  |
| 41        | 19,91 $\pm$ 1,02                 | 21,45 $\pm$ 1,35                  |
| 0         | 21,87 $\pm$ 1,90                 | 23,61 $\pm$ 1,04                  |
| 17        | 20,58 $\pm$ 0,63                 | 22,06 $\pm$ 2,41                  |

In allen Fällen nimmt die Periodenlänge um Beträge von mehr als 1 h zu, die Verlängerung ist mit  $p < 0,01$  signifikant. Eine Steigerung des Aktivitätsniveaus ist im Vergleich zu den Versuchen in 0,5%igem Äthanol nicht zu erkennen.

1,5% Äthanol vertrugen schon in den Vorversuchen (S. 21) nur wenige Tiere; da aber von Interesse war, ob sich die Tendenz einer von der Drogenkonzentration abhängigen Periodenverlängerung fortsetzen würde, (wie sie von ENRIGHT beschrieben wird), wurden trotz der schlechten Verträglichkeit zwei Versuchsserien angesetzt. Nur zwei Krebse überlebten längere Zeit (8 bzw. 13 Tage) in der Lösung. In beiden Fällen verschwand jegliche erkennbare Tagesrhythmik nach der Drogenzugabe, das Aktivitätsniveau stieg stark an und blieb bis zum Versuchsende erhöht (Hyperaktivität).

#### Kochsalz:

Drei eindeutige Reaktionen waren unter Äthanoleinfluß aufgetreten: Periodenverlängerung, Zunahme der Aktivitätszeit nach der Applikation und Erhöhung des Aktivitätsniveaus bei hohen Konzentrationen. In der Literatur (S. 22) wird als charakteristische Wirkung dieser Droge nur die Periodenverlängerung beschrieben. Es stellte sich die Frage, ob und wie weit die beiden anderen Effekte für Äthanol spezifisch sind. Als nächstes wurde eine physiologisch weitgehend neutrale Droge, Kochsalz, verwendet.

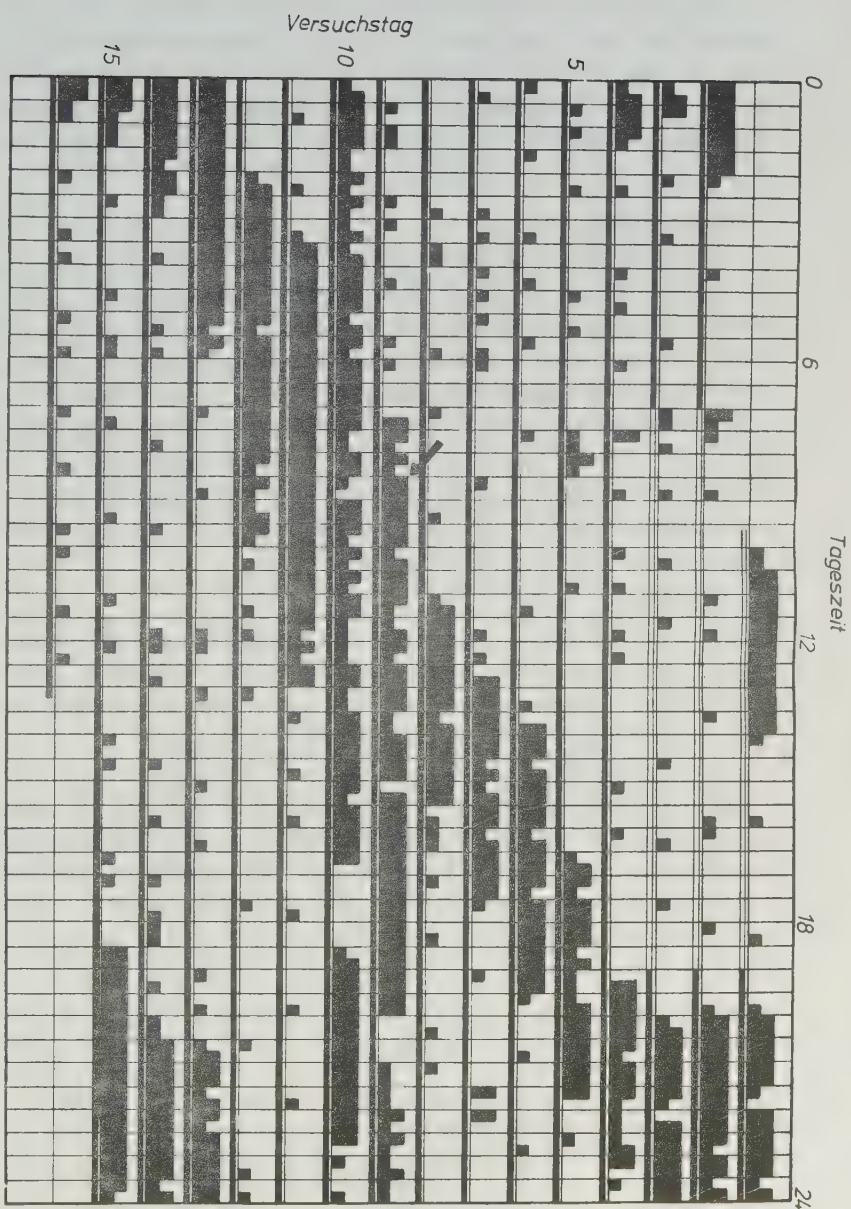


Abb. 12 : Wirkung von NaCl. Die Droge wird am 9. Versuchstag um 8.30 appliziert, das Aktogramm-  
wasser enthält von da an 1% Kochsalz. Nach der Applikation ist die Aktivitätsdauer erhöht, die  
Tendenz des Aktogramms ist...

Ein typisches Versuchsergebnis ist in Abb. 12 zu sehen. Die Periodenlänge blieb unbeeinflusst, die Aktivitätszeit, zu deren Beginn die Droge appliziert worden war, wurde verlängert. In allen Fällen (5 Versuche wurden ausgewertet) lief der ursprüngliche circadiane Rhythmus nach der Applikation weiter, ohne daß eine Drogenwirkung - mit Ausnahme der Aktivitätssteigerung nach der Drogenzugabe - zu erkennen gewesen wäre.

#### Isopropanol:

S. KELLER (1960) berichtet, daß Isopropylalkohol die Blattbewegungsrythmik der Bohne Phaseolus multiflorus in derselben Weise beeinflußt hat wie Äthanol. Versuche an Tieren wurden mit dieser Droge bisher noch nicht durchgeführt. Leider vertrugen die Krebse Isopropanol viel schlechter als Äthanol; schon bei einer Konzentration von 0,5% war ihre Sterblichkeit stark erhöht, bei 1% starben alle Tiere. Die Perioden waren in 0,25%igem Isopropanol nicht verlängert, ebensowenig bei einem gelungenen Versuch in 0,5%iger Lösung. Lediglich die Aktivität stieg nach der Applikation an (4 Versuche).

#### Theobromin:

Die Periodenlängen der Blattbewegungsrythmik von Phaseolus multiflorus nahmen unter dem Einfluß von Theobromin zu (S. KELLER, 1960). Auch von dieser Droge ist bis jetzt keine Auswirkung auf die Tagesrythmik von Tieren beschrieben worden.

Ich testete das Verhalten der Tiere in 0,05%iger Lösung, die Ergebnisse waren uneinheitlich. Die durchschnittlichen Periodenlängen änderten sich nicht signifikant, bei zwei Versuchen waren sie verkürzt, bei drei Versuchen verlängert; die Aktivität stieg auch bei dieser Versuchsserie nach der Drogenapplikation an.

Anders war das Verhalten der Krebse in 0,1%igem Theobromin (Tab. 3).

Tab. 3 Durchschnittliche Periodenlängen unter dem Einfluß von 0,1%igem Theobromin

| Vers. Nr. | $\bar{\tau}$ vor Drogenzugabe | $\bar{\tau}$ nach Drogenzugabe |
|-----------|-------------------------------|--------------------------------|
| 18        | $22,87 \pm 1,38$              | $23,79 \pm 1,46$               |
| 18a       | $22,07 \pm 0,63$              | $23,65 \pm 0,86$               |
| 30        | $20,57 \pm 1,51$              | $23,21 \pm 1,78$               |
| 31        | $21,17 \pm 0,82$              | $22,67 \pm 1,83$               |

Die Droge hatte in allen Fällen eine Zunahme der durchschnittlichen Periodenlänge zur Folge ( $p < 0,05$ ). Auch bei diesen Versuchen nahm die Aktivität nach der Applikation zu, um nach spätestens zwei Perioden wieder den Ausgangswert einzunehmen.

Ein Tier lebte 49 h in 0,25%igem Theobromin; es zeigte keinen Aktivitätsrhythmus mehr, gepaart mit Hyperaktivität.

#### Theophyllin:

Es lag nahe, auch das von der Struktur her eng mit Theobromin verwandte Theophyllin zu prüfen, zumal S. KELLER auch mit dieser Droge Periodenverlängerungen erzielt hatte. EHRET et al (1975) fanden nach Theophyllininjektionen Phasensprünge des frei laufenden Temperaturrhythmus bei Ratten.

Fünf Tiere waren 42 Tage lang in Dauerdunkel Konzentrationen von 0,05% Theophyllin ausgesetzt, höhere Konzentrationen wurden schlecht vertragen. Die Ergebnisse zeigt Tab. 4.

Tab. 4 Durchschnittliche Periodenlänge unter dem Einfluß von 0,05%igem Theophyllin

| Vers. Nr. | $\bar{\tau}$ vor Drogenzugabe | $\bar{\tau}$ nach Drogenzugabe |
|-----------|-------------------------------|--------------------------------|
| 33        | 20,71 $\pm$ 1,02              | 23,87 $\pm$ 1,75               |
| 28        | 21,29 $\pm$ 1,51              | 22,58 $\pm$ 1,91               |
| 27        | 21,75 $\pm$ 1,70              | 23,50 $\pm$ 1,93               |
| 16        | 19,86 $\pm$ 0,97              | 21,05 $\pm$ 2,13               |
| 17        | 20,13 $\pm$ 1,32              | 22,12 $\pm$ 1,45               |

Die Periodenlängen wurden durch die Droge verlängert ( $p < 0,01$ ); sie nahmen bei Versuch Nr. 33 um durchschnittlich mehr als 3 h zu - das ist der höchste Wert, der bei meinen Versuchen auftrat.

#### Coffein:

Ein Xanthinderivat wie Theophyllin und Theobromin ist auch das Coffein, und zwar das mit der stärksten psychotonischen Wirkung (HAUSCHILD, 1973). Es lag nahe, auch diese Droge zu testen.

Erstaunlicherweise blieb die Periodenlänge unbeeinflusst. Bei 6 Krebsen lief der Rhythmus in 0,025%iger und in 0,05%iger Lösung weiter, ohne daß sich eine Änderung der Periodenlänge eingestellt hätte; ein Krebs überlebte 5 Tage lang in 0,1%iger Lösung und behielt auch hier seine Periodenlänge bei.

2) Drogeneinfluß auf die Steuerung der aufeinanderfolgenden Periodenlängen.

Auf S. 14 ist beschrieben, daß die Längen aufeinanderfolgender Perioden voneinander abhängig sind. Nach der dort geschilderten Darstellungsweise wurden die Rhythmen der unter Drogeneinfluß stehenden Krebse ausgewertet. Dabei stellte sich heraus, daß auch die Regelung der circadianen Rhythmik durch die verwendeten Drogen modifiziert wird: In nicht drogenhaltigem Wasser laufende Krebse korrigierten starke Abweichungen vom Mittelwert der Eigenfrequenz an aufeinanderfolgenden Perioden; diese Korrektur fiel bei den unter Drogeneinfluß stehenden Krebsen weg (Abb.13 , dargestellt am Beispiel von Äthanol).

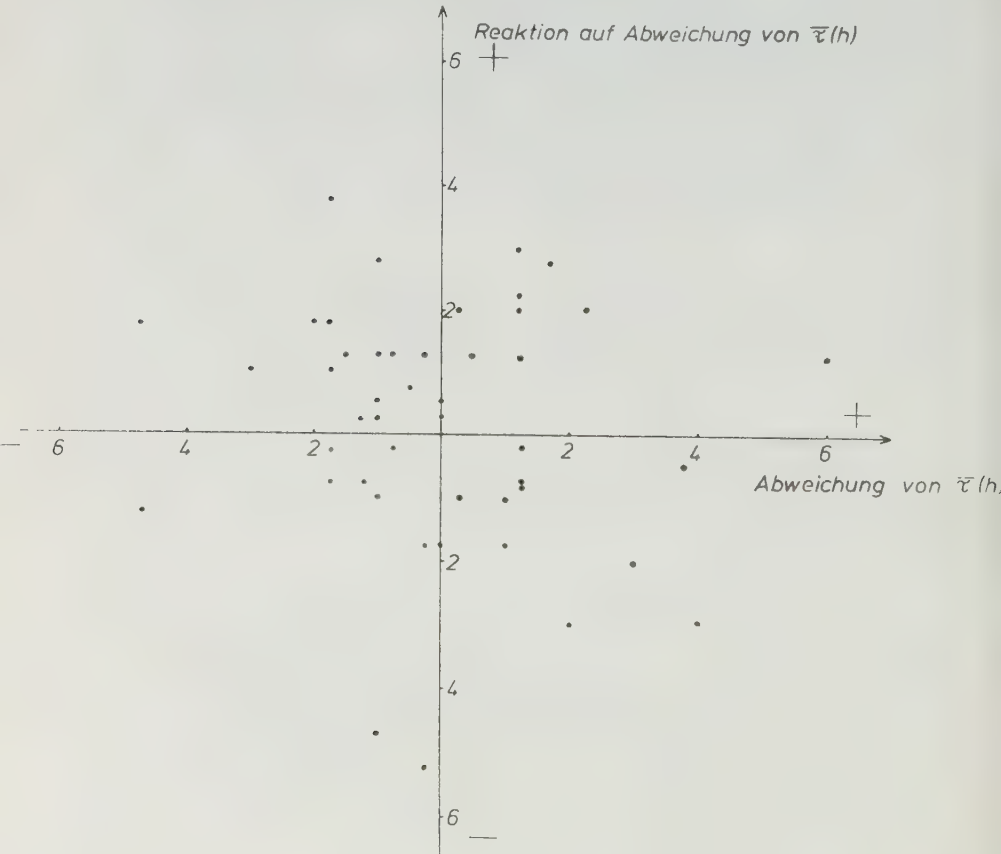


Abb. 13 : Periodenlängen an aufeinanderfolgenden Tagen unter Äthanol-einfluß. Line Beziehung zwischen den Werten aufeinanderfolgender Versuchstage ist nicht nachweisbar ( $p > 0,05$ ).

## 2) Diskussion

**Zusammenfassung der Ergebnisse:** Vor der Interpretation will ich kurz die bisher erzielten Ergebnisse zusammenfassen. Unter dem Einfluß der Drogen traten verschiedene Modifikationen der frei laufenden Rhythmen auf, die sich teilweise bei allen verwendeten Drogen fanden, teilweise waren sie auf bestimmte Drogen beschränkt.

Zwei der beschriebenen Effekte waren bei meinen Versuchen unabhängig von der chemischen Natur und der (so weit geprüft) Konzentration der Droge. Zum einen nahm bei allen Drogenversuchen das Aktivitätsniveau für eine, höchstens drei Perioden nach der Applikation zu (S. 22, 26, 27). Zum anderen ist eine Beziehung zwischen den Längen aufeinanderfolgender Perioden, wie sie bei in normalem Wasser laufenden Tieren auftrat, bei den unter Drogeneinfluß stehenden Krebsen nicht mehr zu finden (S. 28). Beide Effekte traten bereits bei den niedrigsten der verwendeten Konzentrationen auf.

Drei Drogen, nämlich Äthanol, Theobromin und Theophyllin, wirkten periodenverlängernd. Eine derartige Wirkung auf Aktivitätsrhythmen von Tieren bei Theophyllin und Theobromin war bisher nicht beschrieben. Bei allen drei Drogen lagen die Verlängerungen im Bereich von 2 h pro Periode, der höchste Wert (Theophyllin-Versuch Nr. 33) lag bei 3 h pro Periode.

Drei mal (bei zwei Äthanol- und einem Theobrominversuch) fiel nach der Applikation die Tagesrhythmik weg, gleichzeitig war das Aktivitätsniveau erhöht. In allen drei Fällen lagen die Drogenkonzentrationen knapp unter der Letalitätsgrenze. Da der Effekt nur drei mal auftrat, ist eine eindeutige Aussage darüber, ob er für Äthanol und Theobromin spezifisch ist, nicht möglich.

**Interpretation:** Ein Fernziel aller Drogenversuche ist, Hinweise auf den Mechanismus der "Inneren Uhr" zu finden. Kennt man eine Substanz, die reproduzierbare Änderungen hervorruft, so kann man die Frage stellen, wo ihr Angriffspunkt gelegen haben könnte. Spezifische Reaktionen, d. h. solche, die nicht bei jeder verwendeten

Substanz auftraten, fand ich bei Äthanol, Theobromin und Theophyllin. Es stellt sich die Frage, ob sich Gemeinsamkeiten in den Wirkungsspektren dieser drei Drogen finden.

Äthanol: Die Droge wird durch Alkoholdehydrogenase zu Acetaldehyd abgebaut; sie kann zum Aufbau von Glycerin, Glucose und Glycogen verwendet werden. Den tierischen Stoffwechsel kann sie beeinflussen, indem sie in niedrigen Konzentrationen die Wirkung der Cholinesterase fördert, in hohen Konzentrationen hemmt (MUTSCHLER, 1972). Wegen seiner hohen Lipidlöslichkeit wirkt Äthanol bevorzugt auf Nervenzellen (HAUSCHILD, 1973). Die Niveaus von Acetyl-CoA und  $\text{NADH}_2$  werden durch Äthylalkohol erhöht; an Membranen ablaufende Prozesse, auch der Fettstoffwechsel, können beeinflusst werden (FERREL and MICELI, 1972). Außerdem muß man in Betracht ziehen, daß erst ab einer Konzentration von 0,5% eindeutige Modifikationen der frei laufenden Rhythmik auftraten. Dabei sind die physikalischen Eigenschaften des Wassers zweifellos wesentlich verändert.

Die gedrängte Zusammenfassung der wichtigsten physiologischen Eigenschaften von Äthanol zeigt schnell die Problematik, die sich ergibt, will man eine Aussage über den Angriffspunkt der Droge machen. Dabei bleibt zusätzlich zu bedenken, daß Äthanol auf circadiane Rhythmen von Tieren und Pflanzen dieselbe Wirkung zeigt. Damit wird etwa, wie bereits ENRIGHT (1971) schreibt, die Möglichkeit unwahrscheinlich, daß Äthanol über eine Störung des Transmitterhaushalts in die Tagesrhythmik eingreifen könnte. Bei tierischen und pflanzlichen Organismen könnten Vorgänge im Energiestoffwechsel (Fettstoffwechsel,  $\text{NADH}_2$ -Haushalt) oder an Membranen ablaufende Prozesse gestört werden.

Gegen eine Beteiligung des Energiestoffwechsels spricht, daß circadiane Rhythmen auch dann weiterlaufen können, wenn der Energiestoffwechsel bereits im Erliegen ist. Das zeigen Versuche, bei denen die Atmung (WILKINS and WARREN, 1963) oder die Photosynthese (HASTINGS, 1960) reduziert oder die Atmungskette (BÜHNEMANN, 1955) oder der ATP-Haushalt (KELLER, 1960; BÜNNING, 1960; BÜHNEMANN, 1955) gestört wurden.

Die Möglichkeit einer Beteiligung von an Membranen ablaufenden Prozessen wurde erstmals von BÜNNING und BALTES (1962) diskutiert: Die Oberflächenspannung an Membranen könnte durch Ätha-

nol herabgesetzt werden. Auch ENRIGHT hält diese Hypothese für wahrscheinlich. Damit würde bei Vielzellern in erster Linie das Nervensystem, bei Einzellern würden analoge Vorgänge an Membranen beeinflusst. Für diese Möglichkeit spricht auch die Tatsache, daß Membranen an der Entstehung gewisser biologischer Rhythmen nachgewiesenermaßen beteiligt sind: Potentiale, die durch unterschiedliche Ionenverteilung auf den beiden Seiten von Membranen entstanden sind, können Bestandteile von Regelkreisen sein, die in Verbindung mit Enzymaktivitäten und Proteinkonformationen oscillierende Systeme bilden können; auf diese Weise entstehen Kurzzeitrhythmen (HESS and BOITEUX, 1971). Die Störung eines Parameters in einem derartigen Schwingkreis könnte ein verändertes Verhalten des ganzen Systems zur Folge haben.

Methylxanthine: An den unter dem Einfluß der Methylxanthine entstandenen Rhythmen fällt auf, daß Coffein keine den beiden anderen Substanzen ähnliche Zunahme der Periodenlänge hervorruft. Das steht im umgekehrten Verhältnis zur sonstigen physiologischen Wirksamkeit der drei Drogen; HAUSCHILD schreibt: "Die stärkste Wirkung auf das ZNS hat Coffein, Theophyllin ist weit weniger und Theobromin gar nicht wirksam". Dabei bleibt zu bedenken, daß diese Aussage sich auf Säuger bezieht; die Wirkung auf Krebse kann anders sein. Coffein wirkt wahrscheinlich dadurch, daß intrazellulär  $\text{Ca}^{2+}$  freigesetzt wird (SANDOW, 1965).

Die Methylxanthine sind dafür bekannt, daß sie auf den intrazellulären C-AMP-level einwirken können (BUTCHER and SUTHERLAND, 1962). Vor allem Theophyllin hat diese Wirkung: C-AMP wird durch eine spezifische Esterase (Phosphodiesterase) inhibiert, die durch Theophyllin blockiert werden kann, was eine Erhöhung des C-AMP-Spiegels zur Folge hat (COLE and TWAROGG, 1972). Darin läßt sich wieder ein Hinweis auf die Beteiligung von Membranen am Zustandekommen frei laufender Rhythmen sehen: Das C-AMP-System steht im engen Zusammenhang mit Membranen, weil die Adenylatcyclase (das Enzym, das AMP durch Abspaltung von Pyruvat aus ATP bildet), an Membranen gebunden ist (BUTCHER and SUTHERLAND).

Auffallend ist, daß die beiden in Bezug auf circadiane Rhythmen aktiven Methylxanthine, Theobromin und Theophyllin, auch Zellteilungsgifte sind. Sie hemmen die Teilung des Cytoplasmas, nicht des Kerns. BÜNNING (1957) schreibt, daß es jedenfalls interessant sei, daß gerade solche Drogen die endogene Rhythmik stören, durch die auch die cytoplasmatische Ordnung gestört werden kann.

E. Das tagesrhythmische Verhalten in Theophyllinlösung  
bei L/D und anschließendem D/D

Am Zustandekommen des tagesrhythmischen Verhaltens der Krebse bei L/D waren, wie auf S. 9 beschrieben, endogene und exogene Faktoren beteiligt. Die im folgenden geschilderten Versuche sollten klären, ob sich der synchronisierte Aktivitätsrhythmus durch eine Droge beeinflussen läßt, von der bekannt ist, daß sie die Frequenz des frei laufenden Aktivitätsrhythmus verlangsamt. Vergleichende Untersuchungen von pharmakologischer Beeinflussbarkeit frei laufender und synchronisierter Tagesrhythmen liegen bisher nicht vor. Auch Transients und "Weiterlaufender Licht-Ein-Peak" sollten unter Drogeneinfluß analysiert werden; möglicherweise würden sich dabei Hinweise für exogenen oder endogenen Ursprung der letzteren Verhaltensweise finden. Eine weitere Untersuchung des frei laufenden Rhythmus war nicht geplant, deshalb wurden die Versuche nach drei Tagen L/D und anschließend drei Tagen D/D abgebrochen. Als Testsubstanz wurde Theophyllin in einer Konzentration von 0,05% verwendet (bei dieser Konzentration waren signifikante Periodenverlängerungen aufgetreten, S. 27); die Droge war von Versuchsbeginn an im Aktographenwasser enthalten.

1) Die Periodenlängen in theophyllinhaltigem Medium

Die Periodenlängen der frei laufenden Rhythmen waren, wie zu erwarten war, im Vergleich zu den Kontrolltieren verlängert (Abb. 14). Theophyllin wirkte also periodenverlängernd, unabhängig davon, ob es bei L/D oder D/D appliziert wurde.

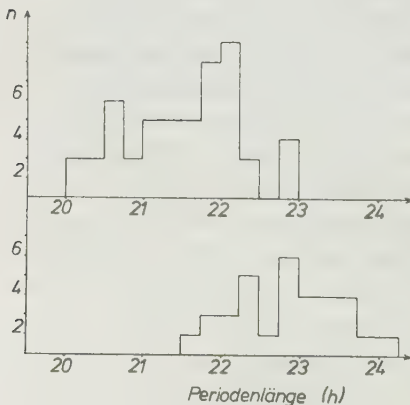


Abb. 14: Periodenlängen frei laufender Rhythmen in Normalmedium (oben) und in Theophyllinmedium (unten).

## 2) Der Aktivitätsbeginn bei L/D

Bei den in normalem Wasser laufenden Krebsen fiel der Beginn der Hauptaktivität keineswegs genau mit Licht-Aus zusammen, vielmehr konnte er kurz vor oder nach 19<sup>00</sup> erfolgen. Die Vorverlegungen lassen sich, wie auf S.15 dargelegt, auf eine negative Phasenwinkeldifferenz zwischen Oscillator- und vorgegebenem Hell-Dunkel-Rhythmus zurückführen. Es wäre zu erwarten, daß unter dem Einfluß von Theophyllin derartige Vorverlegungen vermindert auftreten oder wegfallen, da die periodenverlängernde Wirkung der Droge den Aktivitätsbeginn auf den Licht-Aus-Zeitpunkt zu oder in die Dunkelphase hinein verschieben sollte. Unter derselben Drogenwirkung sollten auch die Aktivitätsanfangspunkte stehen, die ohnehin bereits in der Dunkelphase liegen; eine weitere Verschiebung in die Dunkelphase wäre zu erwarten. Allerdings wirkt hier in entgegengesetzter Richtung der Zeitgeber Licht-Aus, der um 19<sup>00</sup> einsetzt. Der Versuch sollte zeigen, ob sich eines der beiden antagonistisch wirksamen Systeme als stärker erweisen würde.

Die Aktogramme von 30 unter den angegebenen Bedingungen laufenden Krebsen wurden ausgewertet. Die Vorverlegungen waren, wie erwartet, auf den Licht-Ein-Zeitpunkt zu verschoben. Bei den Tieren, die während der Dunkelphase aktiv wurden, war allerdings keine auf eine Periodenverlängerung zurückführbare Verhaltensänderung zu erkennen, vielmehr näherte sich auch hier der Aktivitätsbeginn dem Licht-Aus-Zeitpunkt. Eine genaue Darstellung der Ergebnisse zeigt Abb. 15, in der, wie in Abb. 7 (S. 15), der Aktivitätsbeginn der Krebse eingetragen wurde.

Vergleicht man Abb.15 mit Abb. 7, so zeigt sich, daß die Punkte der Abb. 15 signifikant weniger streuen als die von Abb. 7. Die Aktivitätsanfangspunkte liegen bei den in Theophyllinlösung laufenden Tieren signifikant näher bei 19<sup>00</sup> ( $p < 0,01$ ) als bei den Kontrolltieren; das gilt für die Krebse, die vor 19<sup>00</sup> aktiv wurden, ebenso wie für diejenigen, deren Aktivität nach 19<sup>00</sup> einsetzte. Die Krebse waren also in Theophyllinlösung "pünktlicher" als in normalem Wasser.

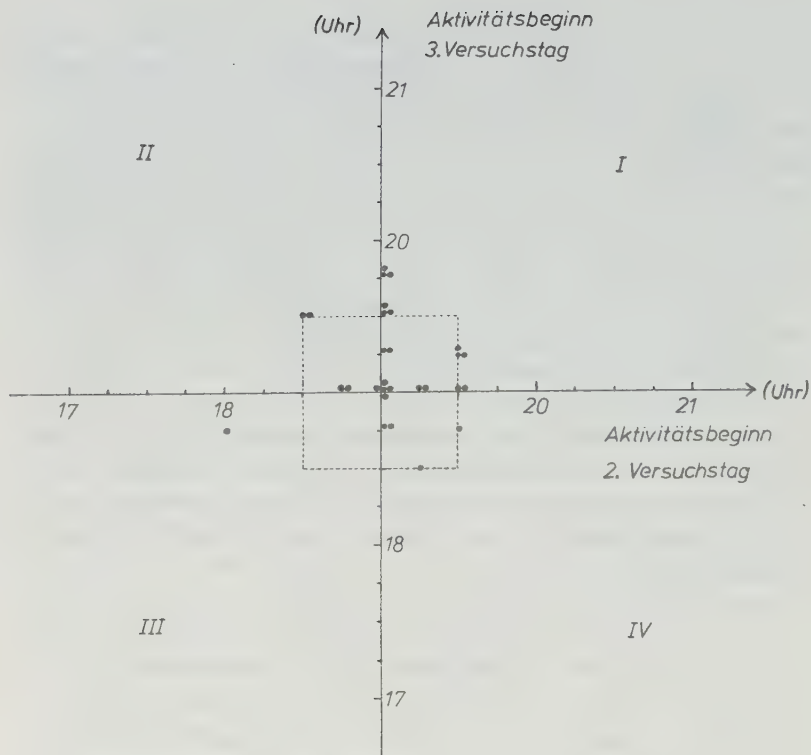


Abb. 15 : Aktivitätsanfangspunkte bei L/D an den Versuchstagen 2 und 3 in theophyllinhaltigem Medium.

18 von 40 (45%) von den in normalem Wasser laufenden Krebsen (Abb. 7) wurden mehr als 0,5 h vor oder nach 19<sup>00</sup> aktiv (Punkte außerhalb des durchbrochen gezeichneten Quadrates), bei den in Theophyllinlösung laufenden Tieren waren es 4 von 25 (ca. 16%). In Abb. 15 läßt sich durch die Punkteschar keine signifikante Gerade legen wie in Abb. 7.

### 3) Transients

Auf S. 10 ist beschrieben, daß die erste Periode in D/D ein Transient ist; ihre Periodenlänge liegt zwischen 24 h und der des frei laufenden Rhythmus. Abb. 16 zeigt die Periodenlängen der unter Theophyllineinfluß laufenden Krebse am 1. Tag in D/D im Vergleich zu der aus den folgenden Tagen berechneten Durchschnittsperiodenlänge. Eine signifikante Abweichung am 1. Tag in D/D ist hier nicht zu erkennen, ( $p > 0,05$ ), d.h. Transients sind im Gegensatz zu den in normalem Wasser laufenden Krebsen nicht nachweisbar.

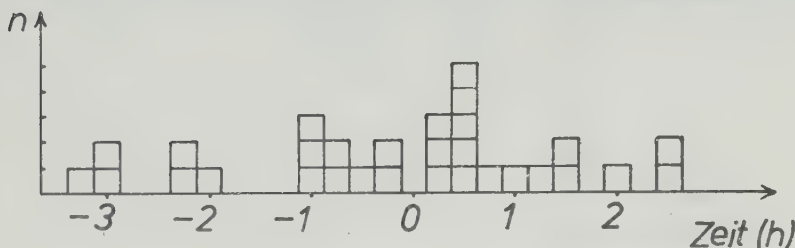


Abb. 16 : Relative Periodenlängen am 1. Tag in D/D unter Theophyllineinfluß.

### 4) Der Aktivitätspeak nach Licht-Ein

Der Aktivitätsbeginn bei Licht-Aus unterschied sich bei den Tieren in drogenhaltigem Wasser von dem der Kontrolltiere (S.33 ). Die Frage stellte sich, ob vergleichbare Effekte auch bei der auf Licht-Ein folgenden Aktivität auftreten würden.

Das Aktivitätsverhalten von in Theophyllinlösung laufenden Krebsen bei Licht-Ein und die Fortsetzung dieses Aktivitätspeaks in D/D ist in Abb. 17 b dargestellt, Abb. 17 a faßt im Vergleich die Aktogramme der unbeeinflussten Krebse zusammen. Vom Periodogramm auf S. 11 unterscheiden sich die Darstellungen dadurch, daß nur die Aktogramme von Tieren verwendet wurden, die nach Licht-Ein

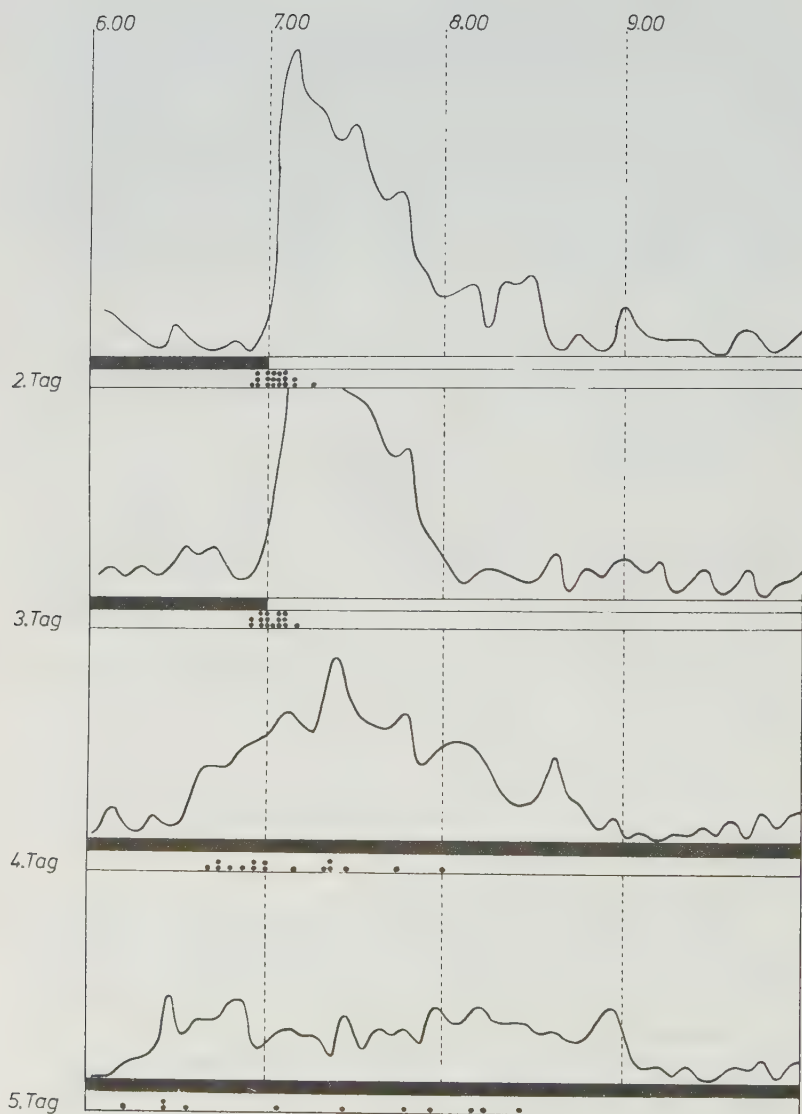


Abb. 17a : Zusammenfassendes Periodogramm des Licht-Ein-Peaks und seiner Fortsetzung in D/D von nicht unter Drogeneinfluß stehenden Krebsen.

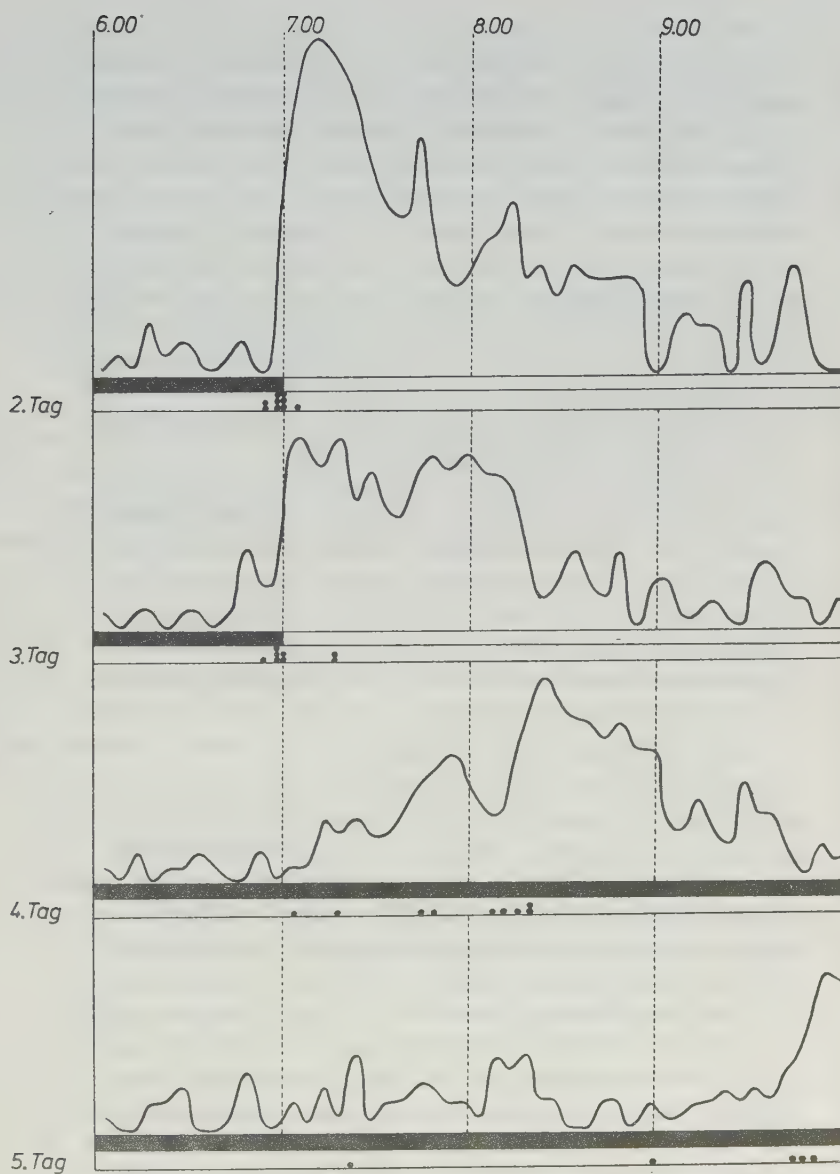


Abb. 17b : Zusammenfassendes Periodogramm des Licht-Ein-Peaks und seiner Fortsetzung in D/D von unter Theophyllineinfluß stehenden Krebsen.

einen Aktivitätspeak zeigten, der sich an mindestens einem der ersten beiden Tage in D/D innerhalb von 2 h vor oder nach dem Licht-Ein-Zeitpunkt wiederholte; außerdem wurden nur die Aktivitäten im Bereich von 1 h vor bis 2 h nach dem Licht-Ein-Zeitpunkt (der bei allen Drogenversuchen bei 7<sup>00</sup>, bei einigen Kontrollversuchen um 9<sup>00</sup> lag) umfaßt. Als Klassengrößen wurden nicht 15 min- Intervalle, sondern 5 min- Intervalle verwendet; da die Aktivität nach Licht-Ein weniger lang beibehalten wurde als nach Licht-Aus (S. 16), war es auch denkbar, daß eine etwaige Drogenwirkung nur dann erkennbar würde, wenn der Maßstab eine genauere Quantifizierung der Aktivität erlaubt. Zur Gesamtverteilung der Aktivität sind auch die Aktivitätsanfangspunkte aus den Einzelaktogrammen eingetragen.

Die Hauptaktivität der unter Theophyllineinfluß stehenden Krebse setzte genauer mit Licht-Aus ein als bei den Kontrolltieren (S. 33); ein vergleichbarer Effekt fehlt beim Aktivitätspeak nach Licht-Ein. Die Aktivitätsanfangspunkte der in Theophyllinlösung laufenden Krebse (Abb. 17 b) sind zwar am 3. Tag geringfügig in den Hellbereich verschoben, der Unterschied zu den Kontrolltieren (Abb. 17 a) ist jedoch nicht signifikant absicherbar ( $p > 0,05$ ).

#### 5) Die Fortsetzung des Licht-Ein-Peaks

Der weiterlaufende Licht-Ein-Peak hat Eigenschaften, die den Verdacht aufkommen lassen, daß exogene Zeitgeber an seinem Zustandekommen beteiligt sind (S. 20). Sollte dieser Rhythmus ausschließlich auf einen nicht ausgeschlossenen Zeitgeber zurückzuführen sein, so wäre zu erwarten, daß seine Frequenz auch unter Drogeneinfluß unverändert bleibt. Tatsächlich wird aber die Periode durch Theophyllin verlängert: Am 1. Tag in D/D setzt die Fortsetzung des Licht-Ein-Peaks nicht, wie bei den Kontrollen, um den Licht-Ein-Zeitpunkt verteilt ein, vielmehr ist der Aktivitätsbeginn bei den 9 Krebsen, die diesen Rhythmus zeigten, um durchschnittlich 1 h verschoben, der Aktivitätsbeginn liegt bei 8<sup>00</sup> (Abb. 17 b). Am zweiten Tag in D/D setzt sich diese Tendenz fort. Von 5 Krebsen, bei denen noch eine Fortsetzung des Licht-Ein-Peaks auftrat, ist bei 4

Tieren der Aktivitätsbeginn um 2-3 h verschoben, nur bei einem Krebs (Versuch Nr. 20) ist keine Drogenwirkung erkennbar. Ein Vergleich der Mittelwerte der Aktivitätsanfangszeiten zwischen Kontrolltieren und unter Drogeneinfluß stehenden Tieren ergibt, daß der Unterschied am 1. und 2. Tag in D/D signifikant ist ( $p < 0,01$ ).

#### 6) Diskussion

Aktivitätsbeginn bei L/D: Unter dem gleichzeitigen Einfluß von Droge und Zeitgeber entsprach das Verhalten der Tiere nur teilweise den Erwartungen. Negative Phasenwinkeldifferenzen, die sich in einem Aktivitätsbeginn vor dem Einsetzen des Zeitgebers äußern, traten, wie erwartet, nur vereinzelt auf; die periodenverlängernd wirksame Droge glich die Periodenlänge des endogenen Oszillators, die unter 24 h lag, der des vorgegebenen 24 h L/D-Rhythmus an. Diese Hypothese macht den Wegfall der Vorverlegungen plausibel, sie genügt aber nicht zur Erklärung des weitgehenden Fehlens der Aktivitätsanfangspunkte nach Licht-Aus. Es läßt sich nicht ausschließen, daß die Droge auch positive Phasenverschiebungen bewirken kann. Dafür findet sich ein Hinweis in der Literatur: EHRET, POTTER and DOBRA (1972) beschreiben Phasensprünge nach Theophyllininjektionen, die, abhängig von der Phasenlage der Injektion, positive oder negative Phasenwinkel umspannen können. Freilich bleibt damit ungeklärt, warum bei kontinuierlicher Drogeneinwirkung die Richtung der Phasenverschiebung sich ändern sollte.

Denkbar ist auch, daß Theophyllin den Effekt des "Positiven Maskierens" (ASCHOFF, 1964) verstärkt. Mit "Positivem Maskieren" wird die Eigenschaft eines Zeitgebers bezeichnet, nicht nur einen endogenen Rhythmus synchronisieren zu können, sondern auch eine momentane Reaktion auf den Umweltreiz herbeizuführen. Positive Phasenwinkeldifferenzen sind dann nicht mehr erkennbar, weil eine mit dem Zeitgeber einsetzende Aktivität einen nachverlegten Aktivitätsbeginn überdeckt. Es ist wahrscheinlich, daß in der Theophyllinlösung, also einer zusätzlich veränderten Umwelt bei den Versuchstieren im Vergleich zu den Kontrolltieren, die Reizschwelle für Licht-Aus erniedrigt ist und die Krebse darum genauer mit Licht-Aus aktiv werden.

Transients: Die Tatsache, daß unter Theophyllineinfluß keine Transients mehr nachweisbar sind, läßt sich mit der periodenverlängernden Wirkung der Droge erklären. Da Transients Zwischenwerte zwischen dem vorgegebenen Rhythmus und der Eigenfrequenz einnehmen, werden sie weniger deutlich auftreten, wenn sich die Eigenperiodenlänge 24 h nähert. Zieht man außerdem in Betracht, daß die Periodenlänge des frei laufenden Rhythmus auf Grund der Versuchsdurchführung weniger genau ermittelt werden konnte als bei den Kontrollen (nach 3 Perioden in D/D wurden die Versuche abgebrochen), so wird verständlich, daß Transients nicht mehr erkennbar sind.

Licht-Ein-Peak und seine Fortsetzung in D/D: Das grundsätzliche, schon auf S.20 angesprochene Problem bei der Interpretation dieses Rhythmus besteht darin, daß die Möglichkeit einer Beteiligung exogener Faktoren am Zustandekommen des weiterlaufenden Licht-Ein-Peaks nicht von vorne herein ausgeschlossen werden kann. Dafür spricht in erster Linie, daß der Rhythmus des weiterlaufenden Licht-Ein-Peaks bei den Kontrolltieren eine nahe bei 24 h liegende Periodenlänge hat (S.16 ).

Wenn ein nicht kontrollierter Außenfaktor die Ursache des weiterlaufenden Licht-Ein-Peaks sein sollte, so müßte der Zeitgeber bei L/D gleichzeitig mit Licht-Ein erfolgen (z.B. Erschütterungen durch vorbeifahrende Trambahn, Autos). Bei D/D würde der weiterhin von den Krebsen registrierte Faktor bewirken, daß die Tiere nach wie vor zum Licht-Ein-Zeitpunkt aktiv werden. Eine Orientierung ausschließlich an diesem "Sekundärzeitgeber" könnte zur Folge haben, daß die Reaktion auf ihn weniger genau ist als bei gleichzeitiger Orientierung am "Hauptzeitgeber" Licht-Ein; das könnte die verstärkt auftretenden Abweichungen vom Licht-Ein-Zeitpunkt bei D/D erklären (Abb. 17 a).

Sollte diese Möglichkeit zutreffen, so müßte bei einer Änderung des Zeitpunktes von Licht-Ein, also einem zeitlichen Trennen von "Haupt"- und "Nebenzeitgeber", die Fortsetzung in D/D wegfallen. Darum habe ich bei einer Versuchsserie in normalem Wasser die Schaltzeiten verschoben (Licht-Ein um 9<sup>00</sup>, Licht-Aus um 21<sup>00</sup>). Auch bei dieser Versuchsserie lief bei einem Krebs der Licht-Ein-Peak in D/D weiter. Dieser Befund spricht gegen die Existenz eines nicht ausgeschlossenen Zeitgebers.

Eine endgültige Klärung des Problems brachten auch die Drogenversuche nicht. Das Fehlen eines Drogeneffekts beim Licht-Ein-Peak (S. 35) kann man (im Gegensatz zum Beginn der teilweise endogenen kontrollierten Hauptaktivität, S. 33) als Argument gegen eine Beteiligung endogener Komponenten betrachten: Eine naheliegende Erklärung wäre darin zu sehen, daß Licht-Ein-Peak und Hauptaktivität prinzipiell verschiedene Ursachen haben; der Licht-Ein-Peak wäre ausschließlich als Reaktion auf eine plötzliche Umweltänderung zu verstehen, an deren Entstehung keine endogenen Faktoren beteiligt sind, die durch Theophyllin beeinflusbar wären. Die Ansicht, daß die Aktivität nach Licht-Ein bei Flußkrebsen rein exogen bedingt ist, wird von verschiedenen Autoren vertreten (KALMUS, 1938 b; PAGE and LARIMER, 1972), allerdings wird hier keine Fortsetzung des Licht-Ein-Peaks beschrieben. Da aber bei Licht-Ein der Aktivitätsbeginn bei unbeeinflussten Tieren nicht in dem Maße wie bei Licht-Aus um den Zeitpunkt des Helligkeitssprungs schwankte (S. 19, Abb. 9), wäre auch dann nur mit einer schwächeren Drogenwirkung zu rechnen, wenn man eine Beteiligung endogener Faktoren in Betracht zieht. Einen eindeutigen Hinweis auf endogene oder exogene Ursache der Fortsetzung des Licht-Ein-Peaks liefern diese Werte nicht.

Für die Annahme der Endogenität des weiterlaufenden Licht-Ein-Peaks spricht die Beeinflussbarkeit dessen Periodenlänge durch Theophyllin. Wollte man die Ergebnisse mit der Annahme eines "Nebenzeitgebers" erklären, so wäre zu fordern, daß unter dem Einfluß der Droge in D/D die Reaktion der Krebse auf den "Nebenzeitgeber" derart modifiziert ist, daß die Aktivität mit von Tag zu Tag zunehmender Verspätung einsetzt. Das ist unwahrscheinlich.

Insgesamt sprechen die Ergebnisse dafür, daß der weiterlaufende Licht-Ein-Peak endogen gesteuert ist. Es ist bekannt, daß in einem Organismus mehrere circadiane Rhythmen mit verschiedener Periodenlänge ablaufen können, deren Koordination aufgehoben werden kann, wenn ein Zeitgeber fehlt. ASCHOFF et al (1967) beschreibt, daß unter konstanten Bedingungen der Tagesrhythmus der Rektaltemperatur und der Aktivitätsrhythmus einer Versuchsperson unterschiedliche Frequenzen hatten. Auch können verschiedene marine Organismen neben einem circadianen einen cir-

catidalen Rhythmus zeigen; vieles spricht dafür, daß hier zwei Oscillatoren mit unterschiedlichen Frequenzen wirksam sind (Zusf. RENSING, 1973). BARNWELL (1966) bildet ein Aktogramm von Uca minax ab, das unter konstanten Bedingungen aufgenommen wurde; es zeigt gleichzeitig einen circatidalen und einen circadianen Rhythmus. Nach den vorliegenden Ergebnissen ist es wahrscheinlich, daß auch bei Astacus leptodactylus am Zustandekommen des Aktivitätsmusters in D/D mehrere Oscillatoren beteiligt sind.

#### F. Die circadiane Aktivitätsrhythmik von Astacus leptodactylus unter dem Einfluß von Cycloheximid

##### 1) Fragestellung und bisherige Ergebnisse:

Mehrere Untersuchungen auf dem Gebiet der Beeinflussbarkeit circadianer Vorgänge durch Proteinbiosynthesehemmer liegen bereits vor. Sie wurden größtenteils mit pflanzlichen Einzellern durchgeführt, so arbeitete HASTINGS (1960) mit Gonyaulax polyedra, ebenso KARKASHIAN and HASTINGS (1963); SWEENEY and HAXO (1961) verwendeten Acetabularia, FELDMAN (1967) Euglena. Lediglich ENRIGHT (1971) ließ auf einen Vielzeller, nämlich den marinen Isopoden Excirrolana chiltonii, der einen ausgeprägten Gezeitenrhythmus zeigt, den Proteinbiosynthesehemmer Cycloheximid einwirken. Diese Droge inhibitiert nicht nur bei Protozoen, sondern auch bei Metazoen die Proteinbiosynthese (COULSON and HERMANDES, 1971). Außerdem wird der RNS-Stoffwechsel gestört (DIENINGER, 1973; RENSING und DÖRING, 1973).

Cycloheximid änderte das Verhalten bei EINRIGHTs Versuchstieren bei einer Konzentration von  $1 \mu\text{g/ml}$  Aktographenwasser nicht. Im Gegensatz dazu beschreibt FELDMAN eine von der Drogenkonzentration abhängige Verlängerung der Periode der phototaktischen Reaktion der Flagellaten. Die Verlängerungen lagen dabei in der Größenordnung von 4,5 h pro Periode - ein Wert, der bei meinen bisher durchgeführten Versuchen nie erreicht worden war. Sie hatten vielmehr den Eindruck entstehen lassen, als wäre eine durch Drogen bedingte Periodenverlängerung nur bis zu einer gewissen Grenze möglich, nach deren Überschreiten das tagesrhythmische System zusammenbricht. Es war von Interesse, ob diese bisher beobachtete Regelmäßigkeit sich bei einem Proteinsynthesehemmer (falls er sich als wirksam erweisen sollte) bestätigen würde.

Nach ENRIGHT müssen die unterschiedlichen Ergebnisse bei Euglena und Excirolana nicht auf Verschiedenheiten in den rhythmischen Systemen der Untersuchungsobjekte zurückgeführt werden; er hält es für denkbar, daß das im Wasser enthaltene Cycloheximid bei Excirolana nicht bis ins Gewebe und damit in das die Rhythmik regulierende Zentrum gelangt ist, während eine derartige Barriere bei Euglena nicht vorhanden war. Die Größe von Astacus leptodactylus erlaubte es ohne Schwierigkeiten, die Droge zu injizieren; außerdem wurden Versuche mit im Wasser gelöstem Cycloheximid durchgeführt.

2) Die Wirkung von Cycloheximid auf den frei laufenden Aktivitätsrhythmus von Astacus leptodactylus.

Die Wirkung von um Aktographenwasser gelöstem Cycloheximid: Nach dem auf S. 21 beschriebenen Verfahren wurde Cycloheximid in Konzentrationen von 1 und 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Aktographenwasser appliziert. Ein Drogeneffekt trat nicht auf.

Die Wirkung von Cycloheximidinjektionen (1-2  $\mu\text{g}/100$  g Körpergewicht): In Vorversuchen wurde geprüft, ob eine Injektion und die damit verbundenen Manipulationen (Herausnehmen, veränderte Lichtverhältnisse, Einstechen der Nadel) einen Einfluß auf den frei laufenden Rhythmus hat. Leider hat sich herausgestellt, daß tatsächlich bei einem beträchtlichen Teil der Tiere die Tagesrhythmik gestört war. Von 5 Krebsen stellten 3 innerhalb von 2 h nach einer Ringer-Injektion (die zu Beginn einer Aktivitätsphase erfolgt war) jegliche Aktivität ein, an den folgenden Tagen traten nur unregelmäßige Aktivitätsausbrüche auf. Die Rhythmen der beiden anderen Tiere liefen ohne erkennbare Störung weiter. Bei drei weiteren Tieren, bei denen der Eingriff am Ende der Aktivitätszeit oder in der Mitte der Ruhezeit durchgeführt wurde, fiel ebenfalls jegliche Aktivitätsrhythmik weg.\*

13 Flußkrebse mit circadianem Aktivitätsverlauf in D/D wurde Cycloheximid injiziert, und zwar 1 bzw. 2  $\mu\text{g}/100$  g Körperge-

---

\* Dabei schien weder die Stelle der Injektion (Abdomen, hinter dem Carapax, Basis der Augentiele) noch die Menge der injizierten Flüssigkeit von maßgeblicher Bedeutung zu sein; auch ein Krebs, der aus dem Aktographen genommen wurde und an dem die Manipulationen wie bei der Injektion vorgenommen wurden, ohne daß ein Einstich erfolgte, stellte seine Aktivitätsrhythmik ein.

wicht. Die Droge war in Ringer gelöst. Bei dieser Konzentration ist damit zu rechnen, daß 90-95% der Proteinbiosynthese (gemessen an Rattenleberzellen, RENSING und DÖRING, 1973) wegfällt. Bei 11 Krebsen fiel nach der Injektion jegliche Tagesrhythmik weg, bei einem Krebs waren die Perioden schwach verlängert, bei einem anderen verkürzt. Eine einheitliche Tendenz zeichnete sich nicht ab; ich habe die Frage, ob Cycloheximidinjektionen in dieser Konzentration einen Einfluß auf die Aktivitätsrhythmik haben, nicht weiter verfolgt, weil die Versuche bei der geringen Zahl auswertbarer Ergebnisse zu zeitaufwendig waren.

Rhythmik-Wegfall nach Augenstielentfernung und nach Cycloheximidinjektion ( $5 \mu\text{g}/100 \text{ g}$  Körpergewicht): In Vorversuchen waren den Krebsen auch Cycloheximidkonzentrationen über  $2 \mu\text{g}/100 \text{ g}$  Körpergewicht injiziert worden; allerdings war dann in den meisten Fällen die Lebensdauer gesunken (4 Tiere, denen  $10 \mu\text{g}/100 \text{ g}$  Körpergewicht injiziert worden war, gingen innerhalb von 2 h ein; bei einer Konzentration von 4 oder  $5 \mu\text{g}/100 \text{ g}$  Körpergewicht blieben einige Krebse fast drei Wochen am Leben, andere starben nach 24 h). Es war denkbar, daß erst derart hohe Konzentrationen in Bezug auf eine Änderung der Tagesrhythmik wirksam sind; diese Möglichkeit wurde geprüft.

Insgesamt wurde 14 Krebsen, die frei laufende Rhythmen zeigten,  $5 \mu\text{g}/100 \text{ g}$  Körpergewicht injiziert. Bei der ersten Versuchsserie (2 Krebse mit frei laufenden Rhythmen) erfolgte der Eingriff zu Beginn der Aktivitätsphase. Daraufhin waren die Krebse, wie es ihrer normalen frei laufenden Tagesrhythmik nach zu erwarten war, aktiv; die Aktivität sank aber nicht, wie es am Ende der Aktivitätsphase zu erwarten gewesen wäre, wieder ab, sie wurde vielmehr bis zum Tode der Tiere nach 44 h bzw. 69 h auf einem hohen Niveau beibehalten (Abb. 18).

Ein ähnliches Verhalten ist auch nach dem operativen Entfernen der Augenstiele bei Dekapoden beschrieben (KALMUS, 1938 a; ROBERTS, 1944; SCHALLECK, 1942). Ich habe, um die Wirkung der Operation mit der einer Cycloheximidinjektion vergleichen zu können, mehreren Krebsen die Augenstiele an der Basis abgeschnitten. Die meisten operierten Tiere gingen innerhalb weniger Stunden nach der Operation ein, 7 Krebse überlebten mehrere Tage lang. Das erhöhte Aktivitätsniveau war eben-

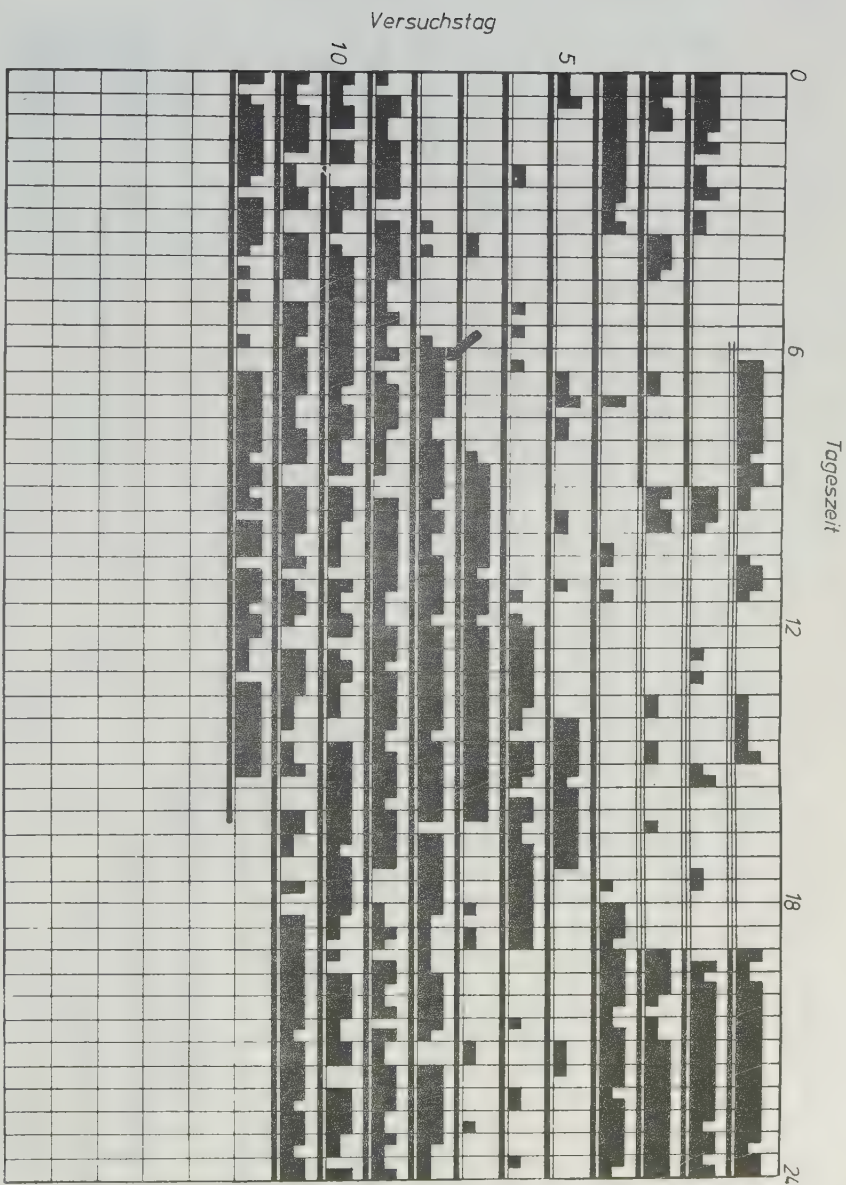


Abb. 18 : Dauer- Aktivität nach Cycloheximidinjektion. Um 6.15 am 8. Versuchstag wurden dem Tier 5µg/100g Körpergewicht Cycloheximid injiziert. Darauf folgt ein vier Tage andauerndes, konstant erhöhtes Aktivitätsniveau (Aktivität/h = 8,11-2,99). Der Versuch endete mit dem Tod des Tieres am 12. Versuchstag.

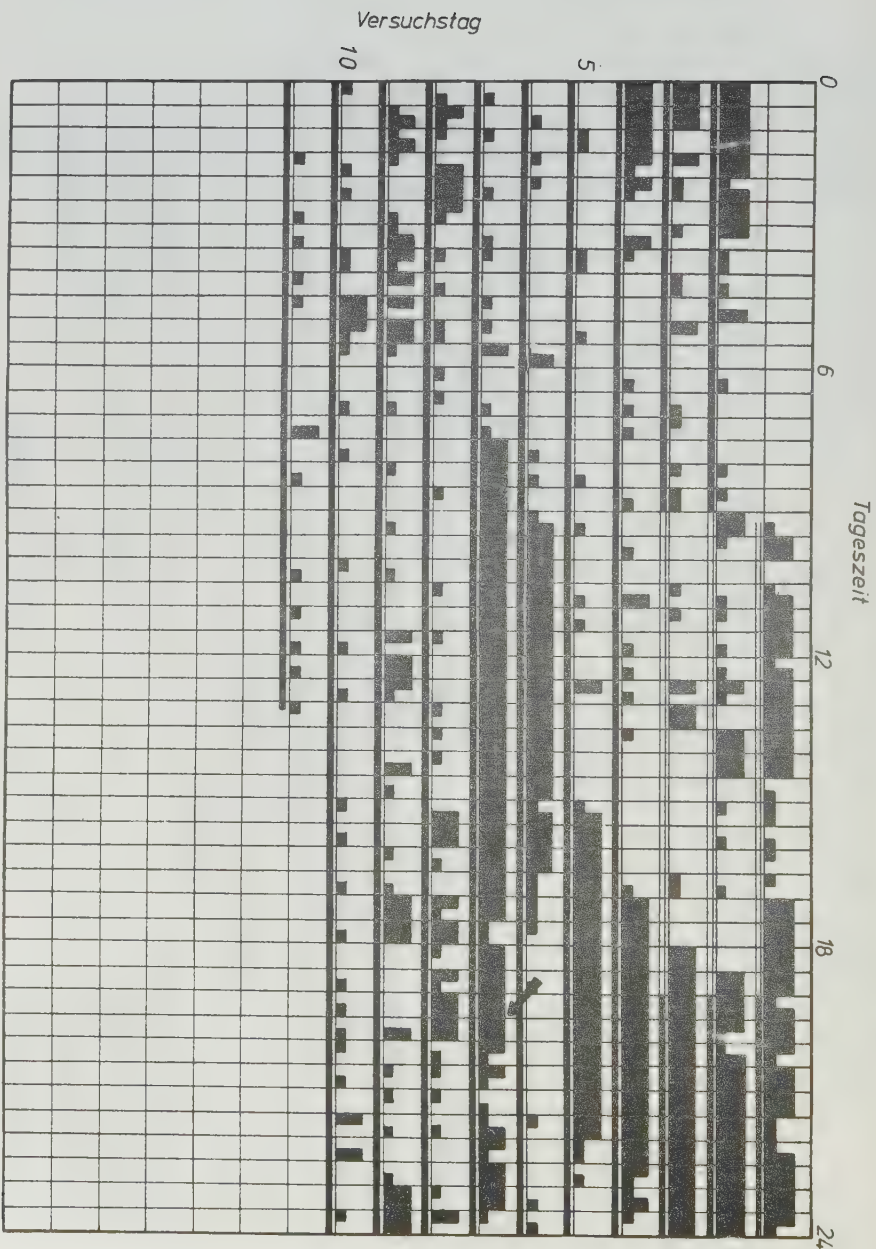


Abb. 19 : Dauer-Ruhe nach Cycloheximidinjektion. Am 7. Versuchstag um 19.30 wurden  $5\text{mg}/100\text{g}$  Körpergewicht injiziert. Das Aktivitätsniveau sinkt daraufhin (Aktivität/h =  $2,22 \pm 1,72$ ), es liegt in derselben Größenordnung wie während der Ruhephasen.

so wie der Wegfall der Tagesrhythmik charakteristisch. Die operierten Tiere unterschieden sich in ihrem Aktivitätsverhalten nicht erkennbar von denen, bei denen nach einer Cycloheximidinjektion das Aktivitätsniveau konstant erhöht war.

Es ist bekannt, daß der Phasenpunkt einer Drogenapplikation einen Einfluß auf das weitere Verhalten der Tiere haben kann. (EHRET et al, 1975; SHIPP and OTTON, 1975). Darum wurde bei der nächsten Versuchsserie während der Ruhepause injiziert, vor allem in der Hoffnung, höhere Überlebensraten zu erreichen.

Das Aktivitätsniveau stieg im Anschluß an die Injektion, wurde mehrere Stunden lang beibehalten, sank dann aber - im Gegensatz zu der vorher geschilderten Daueraktivität - wieder ab und hielt sich in der gleichen Größenordnung wie während der Ruhephase. Erstaunlicherweise trat ein neuer Aktivitätsanstieg zu der Zeit, zu der gemäß der Periodenlänge des Krebses mit einem neuen Aktivitätsanstieg zu rechnen gewesen wäre, nicht ein. Das konstant niedrige Aktivitätsniveau wurde auch während der folgenden Versuchstage beibehalten (Abb. 19).

Die bisher geschilderten Versuche wiesen darauf hin, daß Cycloheximid in einer Konzentration von  $5 \mu\text{g}/100 \text{ g}$  Körpergewicht einmal die Tagesrhythmik zum Erliegen bringt und zum anderen das zum Augenblick der Injektion herrschende Aktivitätsniveau festlegt, es auf einen konstanten Wert "einfriert". Diese These wurde in weiteren Versuchen geprüft. Dabei wurde zu verschiedenen Phasenpunkten injiziert - am Aktivitätsbeginn S, an  $S + \frac{\tau}{4}$ ,  $S + \frac{\tau}{2}$ ,  $S + \frac{3\tau}{4}$ . In allen Fällen kam die Tagesrhythmik zum Stehen, das Aktivitätsniveau blieb während der folgenden Tage konstant. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 5 zusammengefaßt. Als Maß für die Aktivität wurde die Zahl der Aktivitätseinheiten pro Stunde verwendet, deren Mittelwert für die Zeit zwischen der Injektion + 5 h und dem Versuchsende berechnet wurde (Die ersten 5 h nach der Injektion gingen nicht in die Auswertung ein, weil die Aktivität während dieser Zeit beim größten Teil der Versuche wohl als direkte Folge der Injektion erhöht war).

Tab. 5 Aktivitätsmenge/h nach Cycloheximidinjektionen

| Versuch Nr. | Phasenlage            | Aktivitätsniveau |
|-------------|-----------------------|------------------|
| C3          | S                     | 10,52 $\pm$ 2,29 |
| C7          | S                     | 10,58 $\pm$ 1,66 |
| C19a        | S                     | 8,11 $\pm$ 2,99  |
| C18         | S                     | 10,92 $\pm$ 1,46 |
| C23         | S                     | 7,62 $\pm$ 3,17  |
| C22         | *kurz vor S           | 6,87 $\pm$ 3,35  |
| C24         | kurz vor S            | 9,97 $\pm$ 2,11  |
| C5          | S + $\frac{1}{4}\tau$ | 3,02 $\pm$ 1,95  |
| C13         | S + $\frac{1}{2}\tau$ | 2,17 $\pm$ 1,76  |
| C12         | S + $\frac{3}{4}\tau$ | 2,36 $\pm$ 1,79  |
| C4          | S + $\tau$            | 2,0 $\pm$ 2,95   |
| C10         | S + $\frac{5}{4}\tau$ | 1,67 $\pm$ 1,99  |
| C6          | S + $\frac{3}{2}\tau$ | 2,22 $\pm$ 1,73  |
| C9          | S + $2\tau$           | 1,39 $\pm$ 2,32  |

S = Aktivitätsbeginn

\* "kurz vor S" bedeutet "1-2 h vor dem zu erwartenden Aktivitätsbeginn". Die Aktivitätsniveaus der Krebse, denen Cycloheximid zum Zeitpunkt "S" oder "kurz vor S" injiziert worden war, unterschieden sich mit  $p < 0,01$  von denen der übrigen Tiere.

Allen Krebsen, denen Cycloheximid zum Phasenpunkt "S" oder "kurz vor S" injiziert worden war, behielten ein hohes Aktivitätsniveau bei; die Tiere, bei denen die Injektion bei  $S + \frac{1}{4}\tau$ ,  $S + \frac{1}{2}\tau$  oder  $S + \frac{3}{4}\tau$  durchgeführt wurde, waren während der folgenden Tage kaum aktiv.

Eine vergleichbare, von der Phasenlage abhängige Wirkung trat bei der operativen Augenstielentfernung nicht auf. 4 Tiere, denen die Augenstiele bei  $S + \frac{1}{2}\tau$  und ein Tier, bei dem die Operation zu  $S + \frac{1}{4}\tau$  durchgeführt wurde, waren nach der Operation dauernd aktiv.

### 3) Diskussion

Die Cycloheximidversuche waren in der Hoffnung angesetzt worden, Periodenverlängerungen induzieren zu können, die die bisher erreichten Werte überschreiten würden. Diese Erwartung hat sich nicht erfüllt; keine der verwendeten Konzentrationen hatte einen signifikanten Einfluß auf die Periodenlänge, unabhängig davon, ob die Droge im Aktographenwasser enthalten oder dem Krebs injiziert worden war. Statt dessen hat sich überraschenderweise herausgestellt, daß Cycloheximid in einer Konzentration von 5  $\mu$ g/100 g Körpergewicht den Wegfall der Aktivitätsrhythmik zur Folge hat und Verhaltensweisen auftreten, die teilweise denen augenstielloser Krebse gleichen.

Die auf S. 44 aufgeführten Autoren berichten über den Wegfall der Tagesrhythmik nach der Augenstielentfernung. Daneben gibt es Arbeiten, in denen eine nach dieser Operation weiterlaufende Tagesrhythmik beschrieben ist. BLISS (1958) fand bei einem seiner Versuchstiere (*Gecarcinus*) auch nach "eyestalk-removal" einen circadianen Aktivitätsrhythmus, dessen Periodenlänge allerdings verkürzt war. Auch PAGE and LARIMER (1972) berichten, daß sich nach der Augenstielentfernung circadiane Vorgänge weiter beobachten lassen. FINGERMAN (1955) fand 24 h-Rhythmen bei der Stoffwechselrate bei normalen und augenstiellosten *Cambarus affinis* und circadiane Aktivitätsrhythmen, gepaart mit Hyperaktivität, bei *Orconectes clypeatus*. Bei meinen Versuchen konnte ich nie eindeutige Tagesrhythmen nach der Augenstielentfernung feststellen.

Es liegen bereits Untersuchungen vor, in denen über eine Abhängigkeit zwischen der Tageszeit einer Cycloheximidinjektion und der darauf folgenden Reaktion berichtet wird. RENSING und DÖRING (1973) untersuchten den RNS-Gehalt von Rattenlebern in Abhängigkeit von der Phasenlage einer Cycloheximidinjektion und fanden hier eine Beziehung zwischen der Tageszeit der Injektion und der im Anschluß daran synthetisierten D-RNS-Menge und der cytoplasmatischen RNS. DIENINGER (1973) untersuchte ebenfalls das Ribosomensystem von Rattenlebern unter dem Einfluß von Cycloheximid; wird der Ribosomengehalt 20 min nach der Injektion gemessen, so bleibt ein Tagesrhythmus erkennbar, der dem der

Kontrolltiere gleicht, aber eine niedrigere Amplitude hat. Wird die Ribosomenkonzentration 5 h nach der Injektion gemessen, so ist bei den freien Ribosomen kein Tagesrhythmus mehr erkennbar, die gebundenen Ribosomen zeigen einen ähnlichen Tagesverlauf wie die Kontrollen. Diese Befunde sind sicher nicht ohne weiteres auf das die Aktivität regulierende System von Astacus übertragbar; immerhin ist es eine auffallende Parallele, daß auch auf biochemischer Ebene über einen Rhythmikwegfall nach Cycloheximidinjektion berichtet wird. Eine zusätzliche Schwierigkeit bei der Interpretation der bei A. leptodactylus gewonnenen Ergebnisse besteht darin, daß nicht endgültig geklärt ist, welche Komponenten an der Aktivitätsregulation von Krebsen beteiligt sind.

Es gibt Hinweise auf ein in den Augenstielen der Dekapoden gebildetes Hormon, das auf die Aktivität einen inhibierenden Einfluß ausübt (ROBERTS, 1944). Dafür spricht die Aktivitätszunahme nach der Augenstielentfernung ebenso wie der Befund von ROBERTS, daß sich der die Aktivität hemmende Faktor isolieren und übertragen läßt. Auf der anderen Seite laufen tagessrhythmische Vorgänge wie der Farbwechsel von Uca (WEBB, 1954) und der  $O_2$ -Verbrauch von Cambarellus (FINGERMAN, 1955) nach der Augenstielentfernung weiter. PAGE and LARIMER (1972) halten es für wahrscheinlich, daß der tagesrhythmische Oszillator vom Unterschlundganglion aus wirkt. Die im Augenstiel lokalisierten Zentren stehen demnach unter dem Einfluß dieses Oszillators.

Zwar war bei meinen Versuchen kein Unterschied im tagesrhythmischen Verhalten zwischen augenstiellosen Krebsen und Tieren, denen Cycloheximid zu Beginn einer Aktivitätsphase injiziert worden war, zu erkennen; auf die Augenstielentfernung folgte aber in keinem Fall - unabhängig von der Phasenlage der Operation - eine niedrige Daueraktivität. Zweifellos hat Cycloheximid eine andere Wirkung als die Synthesehemmung eines aktivitätsinhibierenden Hormons im Rahmen einer allgemeinen Proteinbiosynthesehemmung. Die Ergebnisse sprechen dafür, daß die zentrale Steuerung im engen Zusammenhang mit Protein- oder RNS-Haushalt steht. Zum Ablauf der "Uhr" wäre zumindest eine von der Proteinbiosynthese abhängige oder mit ihr identische Komponente nötig, deren Fehlen bewirkt, daß das regulierende System auf einem konstanten Niveau gehalten wird.

### Zusammenfassung

Die Arbeit hatte das Ziel, an einem vielzelligen Organismus Möglichkeiten zu prüfen, das tagesrhythmische Aktivitätsverhalten durch Pharmaka zu stören. Dazu wurde zunächst ein Aktograph entwickelt und ein geeignetes Untersuchungsobjekt gewählt. Eingehendere Untersuchungen des tagesrhythmischen Verhaltens von Astacus leptodactylus ergaben, daß endogene und exogene Einflüsse bei diesem Flußkrebis bei L/D am Zustandekommen des Aktivitätsmusters beteiligt sind, und daß die circadiane Aktivitätsrhythmik bei D/D deutlich ausgeprägt ist.

Von den getesteten Pharmaka waren Theophyllin, Theobromin und Äthanol imstande, die Periodenlänge des frei laufenden Rhythmus zu verlängern; daneben traten Effekte auf, die unabhängig von der chemischen Natur der verwendeten Droge und als unspezifisch anzusehen waren.

Steht der endogene Oscillator unter dem gleichzeitigen Einfluß eines als Zeitgeber fungierenden Hell-Dunkel-Wechsels und einer Droge, so dominiert die steuernde Wirkung des Zeitgebers. Bei L/D auftretende endogene Komponenten werden aber in vergleichbarer Weise wie frei laufende Rhythmen in D/D modifiziert. Außerdem ergab sich die Möglichkeit, durch Pharmakawirkung entstandene Effekte als Entscheidungskriterien für die Frage nach endogenem oder exogenem Ursprung eines Tagesrhythmus heranzuziehen.

Der Proteinbiosynthesehemmer Cycloheximid bewirkte nicht, wie von Einzellern beschrieben, Periodenverlängerungen; statt dessen gelang es, von der Phasenlage der Injektion abhängig, das Aktivitätsniveau auf einem von zwei möglichen Pegeln über mehrere Perioden konstant zu halten.

LITERATURVERZEICHNIS

- ASCHOFF, J. : Exogene und endogene Komponente der 24 h -  
Periodik bei Tier und Mensch. Naturwiss. 21, 569,  
1955
- ASCHOFF, J. : The phase-angle difference in circadian  
periodicity. Circadian clocks, Proceedings of the  
Feldafing summer school, 262, 1964
- ASCHOFF, J., GERECKE, U., WEVER, R. : Desynchronisation of  
an human circadian rhythmus. Japan. J. Physiol. 17,  
450, 1967
- ASCHOFF, J., WEVER, R. : Über Phasenbeziehungen zwischen  
biologischer Tagesperiodik und Zeitgeberperiodik.  
Z. vergl. Physiol. 46, 115, 1962
- BALL, N.G., DYKE, J. : The effects of indole-3-acetic and  
2,4- dichlorphenoxycetic on the growth rate and endoge-  
nous rhythm of intact avena coleoptiles. J. Exp. Bot.  
7, 515, 1956
- BARNWELL, F.H. : Daily and tidal patterns of activity in  
individual fiddler crabs (genus Uca) from the woods  
hole region. Biol. Bull. 130,1, 1966
- BLISS, D.E., SPRAGUE, P.C. : Diurnal locomotor activity  
in Gecarcinus lateralis. Anat. Rec. 132, 416, 1958
- BODMAN, K.v. : Die Wirkung von Pharmaka auf Kurzzeitschät-  
zung und circadiane Periodik bei Säugetieren. Z. vergl.  
Physiol. 68, 276, 1970
- BRUCE, V.G., PICTENDRIGH, C.S. : An effect of heavy water  
on the phase and period of the circadian rhythm of Eu-  
glena. Cell. u. Comp. Physiol. 56, 39, 1960

- BÜHNEMANN, F. : Der Einfluß von Stoffwechselgiften und anderen Wirkstoffen auf Oedogonium. Biol. Zentralbl. 74, 691, 1955
- BÜNNING, E. : Über die Urethan- Vergiftung der endogenen Tagesrhythmik. Planta 49, 453, 1957
- BÜNNING, E. : Versuche zur Beeinflussung der endogenen Tagesrhythmik durch chemische Faktoren. Z. Bot. 44, 515, 1960
- BÜNNING, E. : Phasenverschiebung der endogenen Tagesrhythmik durch Reduktion der Atmung. Planta 64, 291, 1965
- BÜNNING, E., BALTES, J. : Wirkung von Äthylalkohol auf die physiologische Uhr. Naturwissensch. 49, 19, 1962
- BUTCHER, R.W., SUTHERLAND, E.W. : Adenosine 3-5- phosphate in biological materials,. J. biol. Chem. 237, 1244, 1962
- COLE, R.A., TWAROG, B.M. : Relaxation of catch in a molluscan smooth muscle. Comp. Biochem. Physiol. 43A, 321, 1972
- COULSON, R.A., HERNANDES, T. : Catabolic effects of cycloheximide in the living reptile. Comp. Biochem. Physiol. 40B, 741, 1971
- DIENINGER, L. : Tagesrhythmus des Ribosomensystems der Ratte unter der Wirkung von Cycloheximid. Z. Naturforschg. 28C, 72, 1973
- PIHNET, C.F., POTTER, V.R., DOBBA, K.W. : Chronotypic action of theophylline and pentobarbital as circadian zeitgebers in the rat. Science 188, 1212, 1975

- ENRIGHT, J.T. : Heavy water slows biological timing processes. *Z. vergl. Physiol.* 72, 1, 1960
- ENRIGHT, J.T. : The internal clock of drunken isopods. *Z. vergl. Physiol.* 75, 332, 1971
- FELDMAN, J.P. : Lengthening the period of a biological clock in *Luglena* by cycloheximide, an inhibitor of protein synthesis. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1967, 1080
- FERREL, J., MICELI, J.N. : Effects of ethanol on membrane lipids. *Comp. Biochem. Physiol.* 41B, 19, 1972
- FINGERMAN, M. : Factors influencing the rate of oxygen consumption of the dwarf crayfish, *Cambarellus shufeldtii*. *Tulane Stud. Zool.* 3, 103, 1955
- HASSENSTEIN, B. : *Biologische Kybernetik*. Quelle und Meyer, Heidelberg 1965
- HASTINGS, J.W. : Biochemical aspects of rhythms: phase shifting by chemicals. *Symp. Quant. Biol.* 25, 131, 1960
- HAUSCHILD, F. : *Pharmakologie und Grundlagen der Toxikologie*. VEB Georg Thieme, Leipzig 1973
- HESS, B., BOITEUX, A. : Oscillatory phenomena in biochemistry. *Ann. Rev. Biochem.* 40, 237, 1971
- HOFFMANN, K. : Zur Beziehung zwischen Phasenlage und Spontanfrequenz bei der endogenen Tagesperiodik. *Z. Naturforsch.* 18B, 154, 1963
- HOFFMANN, K. : Zur Synchronisation biologischer Tagesrhythmen. *Verh. d. Deutsch. zool. Ges.*, 64. Tagung, 266, 1970

- JEREBZOFF, S. : Manipulation of some oscillating systems in fungi by chemicals. Aus: ASCHOFF, J., Circadian clocks. North Holl. publ. Comp. Amsterdam 1965
- KALMUS, H. : Über die Natur des Zeitgedächtnisses bei Bienen. Z. vergl. Physiol. 20, 406, 1934
- KALMUS, H. : Über einen latenten Farbwechsel beim Flußkreb und seine hormonale Beeinflussung. Z. vergl. Physiol. 25, 784, 1938 a
- KALMUS, H. Das Aktogramm des Flußkrebess und seine Beeinflussung durch Organextrakte. Z. vergl. Physiol. 25, 798, 1938 b
- KARAKASHIAN, M.W., HASTINGS, J.W. : The inhibition of a biological clock by actinomycin D. J. gen. Physiol. 44, 34 1960
- KARAKASHIAN, M.W., HASTINGS, J.W. : The effects of inhibition of macromolecular biosynthesis upon the persistent rhythm of luminescence of Gonyaulax. J. gen Physiol. 47, 1, 1963
- KELLER, S. : Über die Wirkung chemischer Faktoren auf die tagesperiodischen Blattbewegungen von Phaseolus multiflorus. Z. Bot. 48, 32, 1960
- MUTSCHLER, E. : Arzneimittelwirkungen. Wiss. Verl.-Ges. 1972, Stuttgart.
- NAYLOR, E. : Locomotory rhythms in Carcinus maenas L. from non- tidal conditions. J. exp. Biol. 37, 481, 1960
- PAGE, T.L., LANIMER, J.L. : Entrainment of the circadian locomotor rhythm in crayfish. J. comp. Physiol. 78, 107, 1972

- PITTENDRIGH, C.S. : Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 25, 159, 1960
- PITTENDRIGH, C.S., DAAN, S. : A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. J. comp. Physiol. 106, 253, 1976
- RENNER, M. : Neue Versuche zum Zeitsinn der Honigbiene. Z. vergl. Physiol. 40, 85, 1957
- RENSING, L., DÖNING, R. : Circadian rhythm of different RNA fractions in rat liver and the effect of cycloheximide. Comp. Biochem. Physiol. 45B, 285, 1973
- RENSING, L. : Biologische Rhythmen und Regulation. G. Fischer, Stuttgart 1973
- ROBERTS, T.W. : Light, eyestalk chemical, and certain other factors as regulators of community activity for the crayfish, *Cambarus viridis*. Ecol. Monogr. 14, 359, 1944
- SANDOW, A. : Skeletal muscle. Ann. Rev. Physiol. 32, 87, 1970
- SCHALLECK, W. : Some mechanisms controlling locomotor activity in the crayfish. J. exp. Zool. 91, 155, 1942
- SCHWEIGER, H.G., SCHWEIGER, W. : Zur Wirkung von Actinomycin D auf *Acetabularia*. Naturwissensch. 50, 602, 1963
- SHIPP, E., OTTON, J. : Diel changes in DDT absorption and breakdown rates and respiratory rhythm in the housefly, *Musca domestica*. Ent. exp. and appl. 19, 235, 1975
- SWEENEY, B.M., HAXO, F.T. : Persistence of photosynthetic rhythm of enucleated *Acetabularia*. Science 134, 136, 1961

- SWEENEY, D.M., HASTINGS, J.W. : Effects of temperature upon diurnal rhythms. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 25, 87, 1960
- WEBB, H.M., BENNETT, M.F., BROWN, F.A. : A persistent diurnal rhythm of chromophoric response in eyestalkless *Uca* pugilator. Biol. Bull. 106, 3, 371, 1954
- WEVER, R. : Zum Mechanismus der biologischen 24-h- Periodik. Kybernetik 1, 139, 1962
- WILKINS, M.B., WARREN, D.M. : The influence of low partial pressures of oxygen on the rhythm of the growth rate of the *Avena* coleoptiles. Planta 60, 261, 1963

### Danksagung

Herrn Prof. Dr. H. Autrum danke ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. Kenner, der mir das Thema stellte und mir bei der Arbeit zur Seite stand.

## Lebenslauf

Ich wurde am 25. März 1948 in Rosenheim geboren als Sohn von Heinz Künast und Ruth Künast, geb. Henneck. Mein Vater unterrichtet am Gymnasium die Fächer Kunsterziehung und Erdkunde.

Die Volksschule besuchte ich in Bamberg; das Abitur erwarb ich am Finsterwalder- Gymnasium in Rosenheim 1968.

Im Wintersemester 1968/69 immatrikulierte ich an der Ludwig- Maximilians- Universität in München für die Fächer Biologie und Chemie. Im Sommersemester 1971 legte ich in Biologie die Vordiplomsprüfung ab, im Wintersemester 1972/73 das Staatsexamen in Biologie und Chemie. Im Anschluß daran begann ich die Doktorarbeit bei Prof. Renner. Vom Juli 1975 an arbeitete ich als Verwalter der Dienstgeschäfte eines wissenschaftlichen Assistenten in der Abteilung von Prof. Renner, ab Oktober 1976 an der TU München/ Weihenstephan am Lehrstuhl für Tierhygiene und Nutztierkunde, Abteilung Zoologie und Parasitologie.









